

# **DIE PLASMAMEMBRAN VON POLYSPHONDYLIUM PALLIDUM**

**Strukturelle und funktionelle Veränderungen während  
der Fruchtkörperbildung**

**INAUGURAL - DISSERTATION**

**zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde**

**vorgelegt der**

**Philosophischen Fakultät II**

**der**

**UNIVERSITÄT ZÜRICH**

**von**

**RUDOLF HINTERMANN**

**aus Beinwil am See**

**Begutachtet von den Herren**

**Prof. Dr. R.W. Parish**

**Prof. Dr. H.R. Hohl**

**aku-Fotodruck Zürich**

**1979**

**1980**



# **DIE PLASMAMEMBRAN VON POLYSPHONDYLIUM PALLIDUM**

**Strukturelle und funktionelle Veränderungen während  
der Fruchtkörperbildung**

INAUGURAL - DISSERTATION

zur Erlangung der Philosophischen Doktorwürde

vorgelegt der

Philosophischen Fakultät II

der

UNIVERSITÄT ZÜRICH

von

RUDOLF HINTERMANN

aus Beinwil am See

Begutachtet von den Herren

Prof. Dr. R.W. Parish

Prof. Dr. H.R. Hohl

aku-Fotodruck Zürich

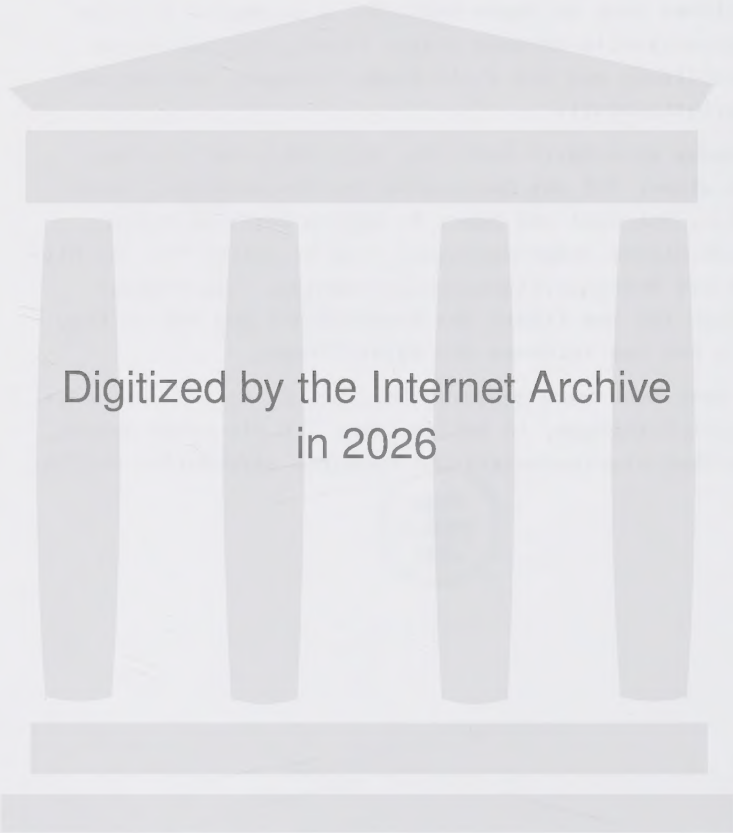
1979



Herzlichen Dank an Herrn Prof. Dr. R.W. Parish für die verständnisvolle Leitung dieser Arbeit, für die stete Unterstützung und die vielfältige Förderung während der Dissertationszeit.

Ich danke auch Herrn Prof. Dr. H.R. Hohl und Frau Rosmarie Widmer für die Durchsicht des Manuskriptes, Herrn Dr. M.L. Philippi und Herrn P. Gehrig für elektronenmikroskopische Untersuchungen, Frau M. Weibel für die Mithilfe bei Phosphorylierungsexperimenten, Frau Kathrin Dietrich für das Tippen des Manuskriptes und meiner Frau Silvia für das Zeichnen von Darstellungen.

Mein Dank geht auch an Herrn Doz. Dr. G. Wolf an der Universität Göttingen, in dessen Labor ich mir einen Ueberblick über elektrophoretische Methoden verschaffen durfte.



Digitized by the Internet Archive  
in 2026

[https://archive.org/details/IA41507213\\_0038](https://archive.org/details/IA41507213_0038)

# INHALTSVERZEICHNIS

|         |                                                                            |    |
|---------|----------------------------------------------------------------------------|----|
| 1       | EINLEITUNG                                                                 | 1  |
| 2       | METHODEN                                                                   | 6  |
| 2.1     | Organismen und Anzucht                                                     | 6  |
| 2.1.1   | Anzucht des Futterbakteriums                                               | 6  |
| 2.1.2   | Anzucht von Dictyostelium discoideum (NC-4)                                | 6  |
| 2.1.3   | Anzucht von Polysphondylium pallidum (Ti-1)                                | 7  |
| 2.1.4   | Gewinnung von Zellen verschiedener Differenzierungsstadien                 | 8  |
| 2.1.5   | Einbau von radioaktiven Metaboliten                                        | 8  |
| 2.2     | Zellfraktionierungen                                                       | 9  |
| 2.2.1   | Isolierung der Plasmamembran (PM)                                          | 9  |
| 2.2.1.1 | Methode mit Con A und Triton X-100                                         | 9  |
| 2.2.1.2 | Methode mit Digitonin                                                      | 10 |
| 2.2.2   | Butanol-Extraktion                                                         | 10 |
| 2.2.3   | Auftrennung eines Homogenats durch Zentrifugation                          | 10 |
| 2.3     | Gelelektrophorese                                                          | 12 |
| 2.3.1   | Färbung der Proteine                                                       | 12 |
| 2.3.2   | Färbung der Glykoproteine                                                  | 12 |
| 2.3.3   | Nachweis von Antigenen                                                     | 13 |
| 2.3.4   | Schätzung des Molekulargewichts der Proteine                               | 13 |
| 2.3.5   | Fluorografie                                                               | 14 |
| 2.3.6   | Trocknen der Gele                                                          | 14 |
| 2.4     | Methoden zur Aufklärung von Verteilung und Funktion der Proteine in der PM | 15 |
| 2.4.1   | $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase                                          | 15 |
| 2.4.2   | $^{125}\text{I}$ -Iodonaphthylazid (INA)                                   | 15 |
| 2.4.3   | $^{14}\text{C}$ -Dinitrofluorbenzol (DNFB)                                 | 16 |
| 2.4.4   | $^{32}\text{P}$ -Adenosintriphosphat (ATP)                                 | 16 |
| 2.4.5   | Markierungen zur Identifizierung von ATP- bzw. AMP-bindenden Proteinen     | 16 |
| 2.4.6   | Fluorescamin                                                               | 17 |

|                                                                                      |        |
|--------------------------------------------------------------------------------------|--------|
| 2.5 Messung von Enzymen und Proteinkonzentrationen                                   | 18     |
| 2.5.1 Alkalische Phosphatase                                                         | 18     |
| 2.5.2 Saure Phosphatase                                                              | 18     |
| 2.5.3 $\alpha$ -Mannosidase                                                          | 18     |
| 2.5.4 $\beta$ -N-Acetyl-Glukosaminidase                                              | 18     |
| 2.5.5 Malatdehydrogenase                                                             | 19     |
| 2.5.6 NADPH-Oxidase                                                                  | 19     |
| 2.5.7 ATP'ase und ADP'ase                                                            | 19     |
| 2.5.8 cAMP-Phosphodiesterase                                                         | 20     |
| 2.5.9 Adenylylcyclase                                                                | 20     |
| 2.5.10 Proteinbestimmung                                                             | 21     |
| <br>3 RESULTATE                                                                      | <br>22 |
| 3.1 Proteine und Glykoproteine der Plasmamembran                                     | 22     |
| 3.2 Topografie der Plasmamembran                                                     | 26     |
| 3.2.1 Proteine der Zelloberfläche                                                    | 26     |
| 3.2.1.1 $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase                                            | 26     |
| 3.2.1.2 $^{14}\text{C}$ -Dinitrofluorbenzol (DNFB)                                   | 27     |
| 3.2.1.3 Fluorescamin                                                                 | 28     |
| 3.2.2 Integrierte PM-Proteine                                                        | 29     |
| 3.2.3 Versuche zur Markierung von ATP- und AMP-<br>bindenden Proteinen der PM        | 31     |
| 3.2.4 Zusammenfassung der Versuche zur Topografie                                    | 33     |
| 3.3 Enzyme                                                                           | 35     |
| 3.3.1 ATP'ase und ADP'ase                                                            | 35     |
| 3.3.2 Proteinkinase                                                                  | 35     |
| 3.3.3 Adenylylcyclase                                                                | 38     |
| 3.3.3.1 Stabilität von Enzym und Inkubations-<br>lösung                              | 39     |
| 3.3.3.2 Wirkung verschiedener Hemmstoffe                                             | 39     |
| 3.3.3.3 Veränderung der Aktivität während<br>der Differenzierung                     | 41     |
| 3.3.3.4 Lokalisierung der Adenylylcyclase                                            | 43     |
| 3.4 Veränderungen im Protein- und Glykoproteinemuster<br>während der Differenzierung | 54     |
| 3.4.1 Markierungen mit $^{14}\text{C}$ -Acetat                                       | 54     |

|                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.4.2 Markierungen mit $^{14}\text{C}$ -Glukosamin und $^3\text{H}$ -Fukose | 59 |
| 3.4.3 Antigene und potentielle Kontaktproteine                              | 64 |
| 4 DISKUSSION                                                                | 66 |
| 4.1 Isolierung der Plasmamembran                                            | 66 |
| 4.2 Methoden zur Markierung der Zelloberfläche                              | 67 |
| 4.3 Versuche zur Identifizierung von ATP- und AMP-bin-<br>denden Proteinen  | 69 |
| 4.4 Aktin und Myosin                                                        | 70 |
| 4.5 Adenylylcyclase                                                         | 72 |
| 4.6 Veränderungen der PM während der Differenzierung                        | 75 |
| 4.6.1 Änderungen im Proteinmuster der PM                                    | 76 |
| 4.6.2 Zell-Zellkontakt (Zelladhäsion)                                       | 77 |
| 4.7 Hypothetisches Modell der PM von <i>P. pallidum</i>                     | 80 |
| ZUSAMMENFASSUNG                                                             | 82 |
| ABKÜRZUNGEN                                                                 | 84 |
| LITERATURVERZEICHNIS                                                        | 85 |



## 1 E I N L E I T U N G

Die Eigenschaften der Oberfläche einer Zelle verändern sich im Laufe von Differenzierungsprozessen. Deshalb sind Untersuchungen der Plasmamembran (PM) zu einem wichtigen Teilgebiet der Entwicklungsbiologie geworden. Zellen erkennen sich gegenseitig und nehmen miteinander Kontakt auf. Dies setzt spezifische Rezeptoren an der Zelloberfläche voraus. Der Kontakt zwischen einzelnen Zellen oder von Zellen mit ihrer Umgebung beeinflusst ihr Verhalten in vielzelligen Organismen und in Kultur. Es lässt sich z.B. beobachten, dass der Zellkontakt bei normalen Zellen in Gewebekultur das Wachstum hemmt, bei Krebszellen jedoch nicht (Marchesi, 1976).

Holtfreter (1939) hat als erster vorgeschlagen, dass spezifische Zellkontakte eine wichtige Rolle in der Bildung von Geweben während der Embryogenese spielen könnten. Da die Wechselwirkungen zwischen den Zellen eines Gewebes komplex sind, ist es schwierig, die Bedeutung des Zellkontakts genau zu erfassen. In einigen Systemen wurden jedoch Erfolge erzielt. Die Untersuchung der Reaggregation voneinander getrennter embryonaler Retinazellen in vitro hat zum Nachweis spezifischer Kontaktproteine in der PM dieser Zellen geführt (Hausman und Moscona, 1976; Brackenbury et al., 1977; Thiéry et al., 1977; Rutishauser et al., 1978a,b). Weiter ist bekannt, dass Lymphocyten spezifisch an Oberflächenantigene anderer Zellen binden, was oft eine Voraussetzung für die Immunreaktion ist (Greaves et al., 1974). Ein drittes System beruht auf der Entdeckung des LETS-Proteins (large, external transformation-sensitive) an der Oberfläche vieler Säugerzellen (Hynes, 1976). Dieses Protein bindet an spezifische Rezeptoren des Kollagens von Basalmembranen (Pearlstein, 1976).

Unter den niederen Organismen bieten sich die Zellulären Schleimpilze als einfaches Modell für das Studium des Zellkontaktes an. Die Aggregation von Einzelzellen bildet hier einen Teil des natürlichen Differenzierungsprozesses (Bonner, 1967). Aus der PM von *Dictyostelium discoideum* wurde ein Gly-

koprotein isoliert, das für den Zellkontakt zu Beginn der Entwicklung verantwortlich ist (Müller und Gerisch, 1978). Während dieser Entwicklung verändert sich die Zusammensetzung der PM (Siu et al., 1977; Parish und Schmidlin, 1979a,b). Diese Veränderungen sind wahrscheinlich für die Chemotaxis, die Aggregation und die Induktion von entwicklungsabhängigen Enzymen von Bedeutung (Sonneborn et al., 1964; Beug et al., 1970; Newell et al., 1971; Siu et al., 1977). Sie sind auch für den Zellkontakt wichtig (Müller und Gerisch, 1978).

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Plasmamembran eines anderen Zellulären Schleimpilzes, *Polysphondylium pallidum*. Der wichtigste Unterschied zwischen dieser Art und *D. discoideum* ist die Verschiedenheit der Aggregationssysteme. Bei Futtermangel aggregieren die amöboiden Einzelzellen (Myxamöben) der Schleimpilze und bilden Fruchtkörper (Fig. 1). Der Aggregationsvorgang wird durch Acrasin gesteuert, eine Substanz, auf welche die Myxamöben chemotaktisch reagieren (Bonner, 1967). Das Acrasin von *D. discoideum* ist cAMP (Konijn et al., 1967), jenes von *P. pallidum* ist noch nicht identifiziert, es ist aber sicher nicht cAMP<sup>1</sup> (Bonner et al., 1972). Neben seiner Funktion als Acrasin von *D. discoideum* hat cAMP bei dieser Art (Bonner, 1970; Parish et al., 1978a; Parish, 1979) und bei *P. pallidum* (Francis, 1975; Hohl et al., 1977) auch differenzierende Wirkungen. *P. pallidum* bietet also den Vorteil, dass cAMP hier auf weniger komplexe Weise in die Differenzierung eingreift. Ist die PM von *P. pallidum* bekannt, lässt sie sich nicht nur mit jener von *D. discoideum* (Siu et al., 1977; Parish und Schmidlin, 1979a) vergleichen, die Ergebnisse ermöglichen auch Experimente zur Unterscheidung von Acrasin- und cAMP-Wirkungen auf die PM.

Die unterschiedlichen Acrasine führten auch zu einer eingehenden Untersuchung der Adenylylcyclase der beiden Arten. Das cAMP-synthetisierende Enzym ist bei *D. discoideum* ein wichti-

<sup>1</sup>Wurster et al. (1976) haben das Acrasin von *P. violaceum* untersucht; es scheint sich um ein Peptid (MG<1500 daltons) zu handeln.

ger Faktor in der Steuerung der Aggregation (Gerisch und Malchow, 1976). Die Adenylylcyclase wurde bei dieser Art an der PM nachgewiesen (Farnham, 1975; Rossomando und Cutler, 1975). Da die Bedeutung des Enzyms für *D. discoideum* und *P. pallidum* verschieden ist, stellt sich die Frage, ob sich dies auch in einer unterschiedlichen Lokalisation des Enzyms in den Zellen der beiden Arten ausdrückt.

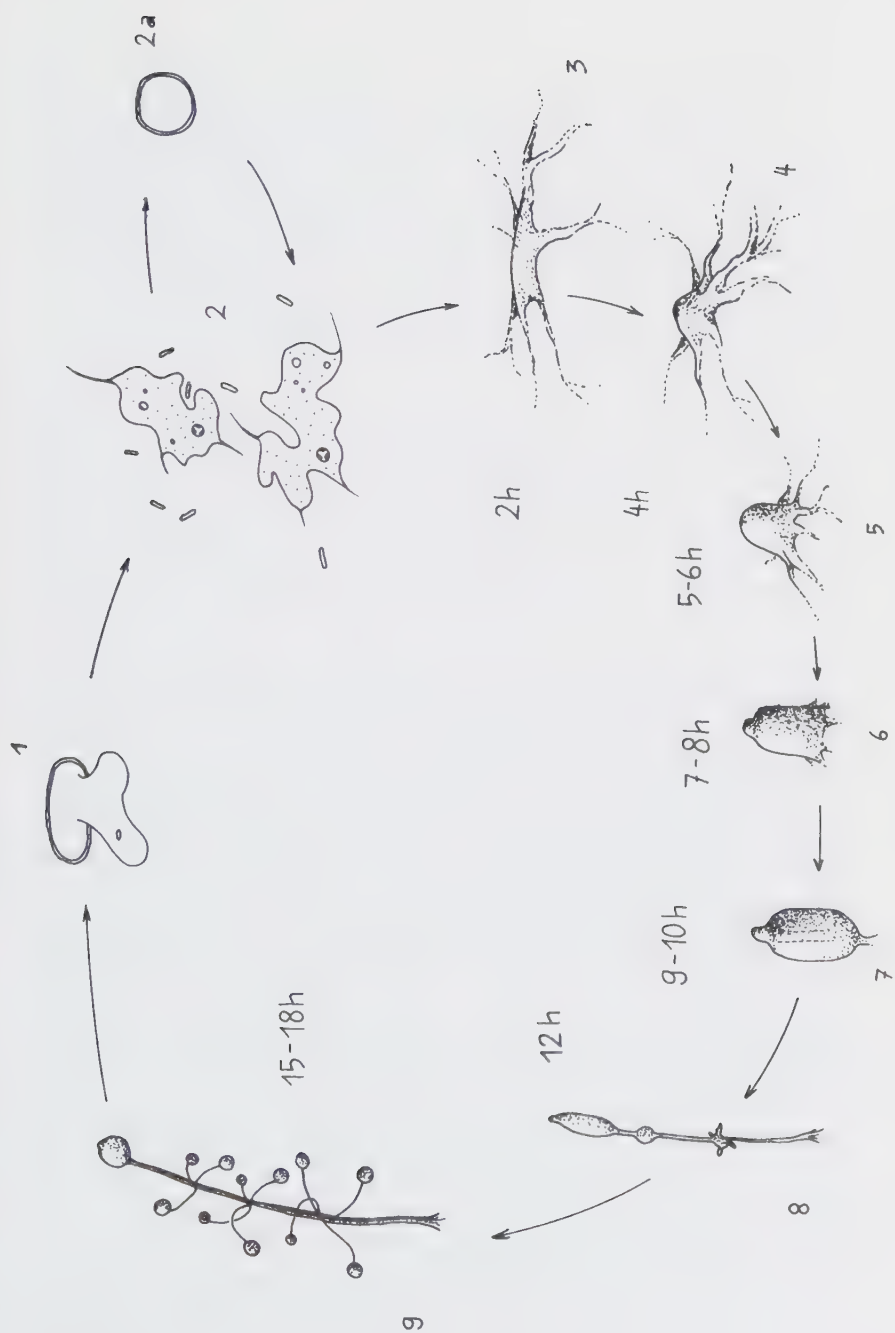
Die erwähnten Kontaktphänomene sind bei *D. discoideum* gut untersucht (Müller und Gerisch, 1978; Parish et al., 1978b; Parish, 1979), bei *P. pallidum* dagegen noch ungenügend (Bozzaro und Gerisch, 1978). Es ist deshalb das Ziel der vorliegenden Arbeit, die Plasmamembran von *P. pallidum* zu charakterisieren und die Veränderungen in ihrer Zusammensetzung im Laufe der Differenzierung zu verfolgen. Wir haben Methoden entwickelt, die es ermöglichen, verschiedene Zellarten miteinander zu fusionieren oder isolierte Proteine in ihre PM einzubauen. Bei solchen Experimenten ist es vorteilhaft, wenn zwei nah verwandte Organismen zur Verfügung stehen, bei denen artspezifische Proteine in der PM dem gleichen Zweck dienen, z.B. der Herstellung von Zell-Zellkontakt.

Fig. 1 Entwicklungszyklus von *Polysphondylium pallidum*

- 1 Keimende Spore
  - 2 Vegetative Phase: Phagocytose von Bakterien, Vermehrung <sup>1</sup>
  - 2a Bildung von Mikrozysten: Jede Myxamöbe kann sich mit einer Cellulosewand umgeben und unter günstigen Bedingungen wieder auskeimen
  - 3 Frühe Aggregationsphase (I in Tab. 4)
  - 4 Mittlere Aggregationsphase (II in Tab. 4)
  - 5 Späte Aggregationsphase (III in Tab. 4)
  - 6 Bildung von papillenartigen Spitzen (IV in Tab. 4)  
Beginn der Stielbildung
  - 7 Frühe Kulminationsphase (V in Tab. 4) <sup>2</sup>
  - 8 Späte Kulminationsphase
  - 9 Reifer Fruchtkörper (2-8 mm)
- 1,2,2a x 2000; 3-9 x 10

<sup>1</sup> Wird das Futterangebot knapp, treten die Zellen in die stationäre Phase (zwischen 2 und 3) über, während der kaum mehr Zellteilungen stattfinden.

<sup>2</sup> Zwischen Aggregation und Kulmination kann sich eine Migrationsphase einschließen: Das Aggregat (Pseudoplasmodium, Slug) kriecht schneckenartig auf der Unterlage umher. Das Migrationsstadium fehlt unter den in dieser Arbeit verwendeten Bedingungen.



## 2 M E T H O D E N

### 2.1 Organismen und Anzucht

Verwendet wird *Polysphondylium pallidum* Olive, Stamm Ti-1, der von Traub (1972) isoliert wurde. In vergleichenden Versuchen wird die verwandte Art *Dictyostelium discoideum* Raper, Stamm NC-4(H), verwendet.

#### 2.1.1 Anzucht des Futterbakteriums

*Escherichia coli* B/r stellt eine günstige Futterquelle für die beiden verwendeten Schleimpilzarten dar und wird auf Standardmedium (SM) nach Bonner (1947) gezogen.

#### 2.1.2 Anzucht von *Dictyostelium discoideum* (NC-4)

Stammkulturen wachsen auf SM/2-Agarplatten (Bonner, 1947). Als Inokulum dient eine Suspension von *E. coli* und Sporen des Schleimpilzes in sterilem 17 mM Phosphatpuffer, pH 6. Von der Suspension werden 0,2 ml auf einer Agarplatte,  $\phi$  9 cm, mit einem Glasstab regelmässig verteilt. Nach einer Inkubationszeit von 3-4 Tagen bei Zimmertemperatur fruktifiziert der Schleimpilz. Bei 4°C bleiben die Sporen einige Monate voll keimungsfähig.

Das Medium für die Anzucht von Myxamöben in Flüssigkultur (Sussman, 1961) setzt sich wie folgt zusammen:

|      |                           |                   |
|------|---------------------------|-------------------|
| 0,5  | g Hefe-Extrakt (Difco)    |                   |
| 5    | g Bacto-Pepton (Difco)    |                   |
| 5    | g Glukose                 |                   |
| 0,5  | g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$    |                   |
| 0,64 | g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ |                   |
| 1,45 | g $KH_2PO_4$              | ad 1000 ml $H_2O$ |

500 ml Medium in 2 l Fernbach-Kolben werden mit einer Oese *E. coli* B/r und 1-2 Oesen Fruchtkörper von *Dictyostelium discoideum* NC-4(H) beimpft. Die Inkubation erfolgt auf einem Rotationsschüttler mit 50 rpm bei 23°C. Nach 44-48 h geht die Kultur vom logarithmischen Wachstum in die stationäre Phase über. Die Dichte beträgt  $2-5 \times 10^6$  Myxamöben/ml Medium.

### 2.1.3 Anzucht von *Polysphondylium pallidum* (Ti-1)

Stammkulturen werden ähnlich wie jene von *Dictyostelium* gezogen. Als Medium dient jedoch 0,1 LP (0,1%-iger Lactose-Pepton-Agar nach Raper, 1951). Die Fruktifikation wird verbessert, indem man die Petrischalen umgekehrt inkubiert und auf den Deckel eine Spatelspitze Aktivkohle verteilt (persönliche Mitteilung von D. Francis).

Grössere Mengen von Myxamöben gewinnt man auf 0,1 LP-Agar in Aluminium-Kuchenblechen (50 x 30 x 2,5 cm). Die Methode wurde von Wehrli (Wehrli und Hohl, unpubl.) ausgearbeitet. Je 400 ml heisser Agar wird in der "Sterile Bench" (Skan) in zwei automatierte Bleche gegossen. Hat sich der Agar abgekühlt und verfestigt, beimpft man jede Platte mit  $2-3 \times 10^5$  Sporen in einer leicht getrübbten Suspension von *E. coli* in 4 ml 17 mM Phosphatpuffer, pH 6. Die eine Platte wird umgekehrt und der andern als Deckel aufgesetzt. Die Wachstumsphase dauert bei 23°C 44-48 h. Nach der Inkubation werden die Myxamöben mit Hilfe eines Glasstabes in 17 mM Phosphatpuffer, pH 7, suspendiert. Uebriggebliebene Bakterien entfernt man durch Zentrifugation während 2 min in einer Tischzentrifuge (Christ Simplex) bei 350 g: Myxamöben sedimentieren, Bakterien bleiben im Ueberstand. Dieser Waschvorgang wird 2-4 x wiederholt. Die Ausbeute von zwei Blechen beträgt  $1-2 \times 10^9$  Zellen.

#### 2.1.4 Gewinnung von Zellen verschiedener Differenzierungsstadien (nach Newell et al., 1969)

Die Differenzierung der Amöben vollzieht sich auf Millipore-Filtern von 47 mm Durchmesser und einer Porengrösse von  $0,45 \mu\text{m}$ , Filtertyp HA. Die Filter werden in einer Petrischale von 5,5 cm Durchmesser auf einer mit 1,5 ml 17 mM Phosphatpuffer (pH 7) befeuchteten Papierunterlage inkubiert. Eine Suspension von ca.  $10^8$  gewaschenen Myxamöben in 0,2 ml Phosphatpuffer wird gleichmässig auf der Filteroberfläche ausgestrichen. Die Petrischalen werden bei Zimmertemperatur am Licht aufbewahrt. Unter diesen Bedingungen differenzieren sich die Zellen synchron und bilden innert 15-20 h Fruchtkörper. Damit *P. pallidum* fruktifiziert, hat es sich als nötig erwiesen, die Filter vor dem Gebrauch mit dest.  $\text{H}_2\text{O}$  zu waschen.

Bei  $4^\circ\text{C}$  wird der Differenzierungsprozess unterbrochen und läuft nach dem Erwärmen auf Zimmertemperatur weiter. Nach dieser Behandlung ist die Entwicklung aber weniger synchron und kann um Stunden verlängert sein.

Wird die Plasmamembran der Myxamöben untersucht, wäscht man die Zellen vom Filter weg, indem man Phosphatpuffer durch eine Pasteurpipette auf die Oberfläche spritzt und die Suspension in einem Becherglas auffängt. In späteren Stadien müssen die Zellen durch mehrmaliges Durchpressen durch die Pasteurpipette deaggregiert werden.

#### 2.1.5 Einbau von radioaktiven Metaboliten während der Differenzierung

Zur Feststellung der Synthesephasen von Proteinen und Glykoproteinen werden die Zellen auf dem Millipore-Filter mit radioaktiven Metaboliten gefüttert. 50-100  $\mu\text{l}$  einer Lösung der betreffenden Substanz in  $\text{H}_2\text{O}$  dest. werden durch Auftupfen mit einer 1 ml Plastik-Spritze auf die Zellen eines Filters verteilt. Folgende Substanzen und Mengen werden verwendet:

(1-<sup>14</sup>C)-Acetat, Natriumsalz, 40-60 mCi/mMol  
Radiochemical Center Amersham  
10 µCi/Filter  
D-(1-<sup>14</sup>C)-Glukosamin Hydrochlorid, 5-10 mCi/mMol  
New England Nuclear  
5-6 µCi/Filter  
L-(6-<sup>3</sup>H)-Fukose, 10-15 Ci/mMol  
New England Nuclear  
10 µCi/Filter

## 2.2 Zellfraktionierungen

### 2.2.1 Isolierung der Plasmamembran (PM)

Es wird vor allem die von Parish und Müller (1976) an *Dictyostelium discoideum* erarbeitete Methode verwendet. Die von Riedel und Gerisch (1968) beschriebene Methode dient zu Vergleichszwecken.

#### 2.2.1.1 Methode mit Concanavalin A (Con A) und Triton X-100 (Parish und Müller, 1976)

0,5-1 x 10<sup>8</sup> gewaschene Zellen von *P. pallidum* werden in 4 ml 17 mM Phosphatpuffer von pH 7 suspendiert und durch Zufügen von Con A bis zur Endkonzentration von 0,1 mg/ml agglutiniert. Die Zellen werden nach 3-5 min sedimentiert und in 1-2 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) suspendiert. Die Zugabe von Triton X-100 bis zur Endkonzentration von 0,3-0,5% bewirkt eine sofortige Lyse der Zellen, wonach die durch Con A stabilisierten Plasmamembranen als "Ghosts" sedimentiert werden (Christ Simplex, 5 min bei 1900 g). Das Sediment wird im Phasenkontrastmikroskop (Zeiss) auf Verunreinigungen durch intrazelluläre Bestandteile untersucht und meistens nochmals durch Suspendieren in 0,1 M Tris-HCl (pH 8,5) und anschließender Zentrifugation bei 1900 g gewaschen.

#### 2.2.1.2 Methode mit Digitonin

(Riedel und Gerisch, 1968; modifiziert)

Gewaschene Myxamöben von *P. pallidum* werden bei einer Dichte von  $2-3 \times 10^7/\text{ml}$  in 30 mM Tricinpuffer von pH 7,0 suspendiert. Die Suspension wird mit dem gleichen Volumen  $4 \times 10^{-4}\text{M}$  Digitonin in 15 mM Tricinpuffer von pH 7,0 versetzt und während 10-15 min leicht gerührt. Die entstandenen Plasmamembran-Ghosts werden durch Zentrifugation während 5 min bei 1900 g sedimentiert. Das Sediment wird im Phasenkontrastmikroskop überprüft, in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) suspendiert und wieder bei 1900 g zentrifugiert.

#### 2.2.2 Butanol-Extraktion

(Maddy, 1966; Huesgen und Gerisch, 1975; modifiziert)

Isolierte PM von aggregierenden Myxamöben werden bei einer Dichte von ca. 5 mg Protein/ml in 10 mM Citratpuffer (pH 5,5) suspendiert. Die Probe wird mit 3/4 Volumen n-Butanol 5 min bei 4°C geschüttelt und anschliessend während 5 min bei 1900 g zentrifugiert. Die wässrige untere Phase wird während 20 h bei 4°C gegen 5000 Volumen 0,5% Triton X-100 dialysiert. Nach einer Zentrifugation von 10 min bei 10'000 g wird der Ueberstand durch Vakuumdialyse eingeengt und mit "Sample Buffer" für die Gelelektrophorese gemischt.

#### 2.2.3 Auftrennung eines Homogenats durch Zentrifugation

Das Homogenisationsmedium (SF-Medium) besteht aus:

0,5 M Sorbit

2,5% Ficoll (Pharmacia)

2 mM Dithiothreitol (DTT, Sigma)

1 mM EDTA

in 50 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,8

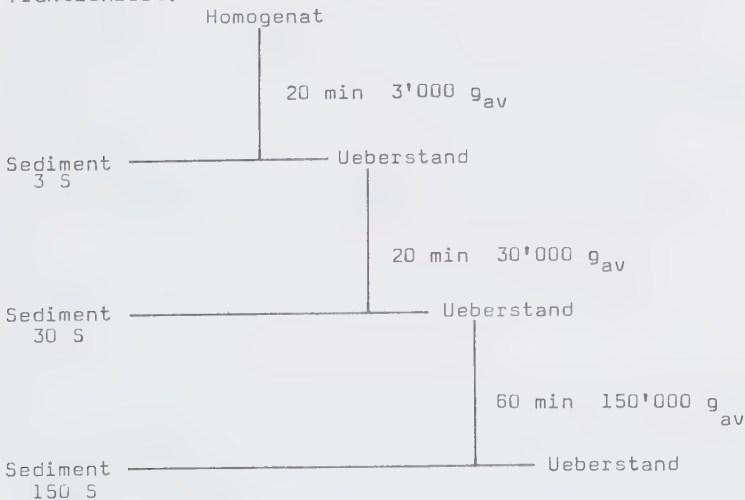
Als Puffer im Dichtegradienten dient 50 mM Tris-HCl von pH 7,8 mit 2 mM DTT und 1 mM EDTA.

## Homogenisation

Gewaschene Myxamöben werden bei einer Dichte von ca.  $10^8/\text{ml}$  in SF-Medium suspendiert. Der Aufschluss erfolgt in einem Potter-Elvehjem Homogenisator, dessen Teflonstößel in einer Bosch Bohrmaschine montiert wird. Nach 50-100 Auf- und Abwärtsbewegungen des rotierenden Stößels im Glasgefäß wird die Suspension 2 min bei 1900 g zentrifugiert. Der Ueberstand wird bei  $4^\circ\text{C}$  aufbewahrt, die ganzen Zellen im Sediment in SF-Medium resuspendiert und nochmals homogenisiert. Fallen nach der Zentrifugation bei 1900 g noch ganze Zellen im Sediment an, werden diese durch Ultraschallbehandlung während 15 sec mit einem Branson B-12 Ultraschallgerät aufgeschlossen.

## Zentrifugation

Das Homogenat wird durch folgende Zentrifugationsschritte fraktioniert:



Der Ueberstand der letzten Zentrifugation wird aufbewahrt. Die drei Sedimente suspendiert man in Gradientenpuffer.

Ist eine weitere Auftrennung erforderlich, werden Saccharosegradienten eingesetzt. Das Homogenat wird 20 min bei 10'000 g<sub>av</sub> zentrifugiert, der resultierende Ueberstand 60 min bei 150'000 g<sub>av</sub>. Dieses Sediment suspendiert man in SF-Medium durch sorgfältiges Behandeln mit einem Duall Gewebehomogenisator nach Potter-Elvehjem. Die Suspension wird auf den Dichtegradienten gebracht. Dieser reicht entweder von 20-45% oder von 30-55% w/v Saccharose und liegt auf einem Kissen aus 60% Saccharose. Die Zentrifugation dauert 2 h bei 190'000 g<sub>av</sub> in einer Beckman Spinco L 65B, Rotortyp SW 50. Der Gradient wird mit einem LKB-Fraktionensammler in 16 (bzw. 8) Fraktionen à 0,3 ml (0,6 ml) unterteilt.

## 2.3 Gelelektrophorese

Die Auftrennung der PM-Proteine erfolgt mittels Polyacrylamid-SDS-Gelelektrophorese nach Laemmli (1970). Die Membran-Ghosts werden aufgelöst durch 3 min Kochen in "Sample Buffer", enthaltend 3% SDS (Sodium Dodecylsulfat), 10% Glycerin und 5% 2-Mercaptoäthanol in 62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8. Das Sammelgel enthält 4,5%, das Trenngel 10% Acrylamid. Das Format des Trenngels beträgt 140 x 80 x 0,8 mm. Der Lauf erfolgt in einer Bio-Rad Slab-Gel Apparatur bei 14°C. Bei einer angelegten Spannung von 200 V dauert der Lauf 2 1/2 h.

### 2.3.1 Färbung der Proteine

Die Proteine werden im Gel nachgewiesen durch Färbung mit Amidoschwarz 10 B (Merck) in 7% Essigsäure und anschliessender Nachfärbung mit Coomassie Brilliant Blue G 250 (Serva) in 25% Isopropanol/10% Essigsäure.

### 2.3.2 Färbung der Glykoproteine

Der Nachweis der Glykoproteine erfolgt nach der Methode von

Wood und Sarinana (1975): Zur Entfernung von SDS wird das Gel 20 h in 25% Isopropanol/10% Essigsäure gewaschen. Alle folgenden Schritte geschehen in 15 mM Posphatpuffer von pH 7. Das Gel wird 2 h gewaschen und 2h in 0,5 mg/ml Con A inkubiert. Ueberschüssiges Con A, das nicht an Glykoproteine gebunden hat, entfernt man durch Waschen während 20 h. Es folgt eine Inkubation (2 h) in 0,1 mg/ml Horse Radish Peroxidase (Calbiochem, B-Grade). Nicht an Con A gebundene Peroxidase entfernt man durch Waschen während 20 h. Jetzt wird die gebundene Peroxidase nachgewiesen, indem man das Gel in eine Lösung von 0,5 mg/ml 3,3'-Diamino-Benzidin-Tetrahydrochlorid (Fluka) und 0,01%  $H_2O_2$  überführt. Es entsteht ein braunes, unlösliches Oxidationsprodukt. Nach 15-20 min wird die Reaktion durch Zugabe von 7% Essigsäure gestoppt.

### 2.3.3 Nachweis von Antigenen

Auf ähnliche Weise werden antigenische Proteine im Gel nachgewiesen (Parish et al., 1978b). Es bestehen folgende zwei Unterschiede zur obigen Färbung: Anstelle der Con A-Behandlung tritt eine Inkubation (5-6 h) in 1:5 mit Phosphatpuffer verdünntem Antiserum aus Kaninchen, denen eine grob vorge-reinigte Membranpräparation von *P. pallidum* gespritzt wurde. Das Antiserum wurde im Labor von C. R. Parish gewonnen und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die zweite Inkubation des Gels erfolgt während 24 h in 0,1 mg/ml Peroxidase-conjugated goat anti rabbit IgG (Miles-Yeda).

### 2.3.4 Schätzung des Molekulargewichts der Proteine

Die Proteine werden in der SDS-Gelelektrophorese hauptsächlich nach ihrer Grösse getrennt. Mit Proteinen bekannten Molekulargewichts lässt sich also eine Eichkurve aufnehmen, mit deren Hilfe das Molekulargewicht der Membranproteine abgeschätzt werden kann. Da diese Bestimmungen nur auf der

Laufgeschwindigkeit im Polyacrylamidgel beruhen, spricht man vom "apparent molecular weight". Vereinfacht wird in der Folge nur vom Molekulargewicht (MG) gesprochen.

Als Referenzproteine wurden verwendet:

|                                    |                       |
|------------------------------------|-----------------------|
| Concanavalin A (Con A, Calbiochem) | 27 kd                 |
| RNS-Polymerase (Boehringer)        | 39 kd, 155 kd, 165 kd |
| Katalase (Sigma)                   | 60 kd                 |
| Transferrin (Calbiochem)           | 77 kd                 |
| Phosphorylase b (Boehringer)       | 93 kd                 |
| $\beta$ -Galactosidase (Sigma)     | 116 kd                |

Anhaltspunkte in jedem Gel sind neben Con A:

|                                   |        |
|-----------------------------------|--------|
| Aktin (Spudich, 1974)             | 42 kd  |
| Myosin (Clarke und Spudich, 1974) | 210 kd |

### 2.3.5 Fluorografie (Bonner und Laskey, 1974)

Gele mit radioaktiv markierten Proteinen werden zur Verkürzung der Exponierungszeit und zum Nachweis von schwach markierten Banden mit 2,5-Diphenyloxazol (PPO) imprägniert. Das Gel wird durch zweimaliges Waschen während je 30 min mit Dimethylsulfoxid (DMSO) gesättigt. Anschliessend inkubiert man während 3 h in einer 22%-igen Lösung von PPO in DMSO und überführt das Gel schliesslich in H<sub>2</sub>O dest. (mindestens 1 h). Das Exponieren erfolgt mit lichtaktivierten Röntgenfilmen (Fuji RX Medical) bei -70°C nach Laskey und Mills (1975). Die Filme werden in Kodak D-19 während 5 min entwickelt, 10 min in Kodak Unifix fixiert und 1 h gewässert.

### 2.3.6 Trocknen der Gele

Die Gele werden zwischen zwei nasse Cellophanfolien gelegt und unter Vakuum bei 60°C getrocknet.

## 2.4 Methoden zur Aufklärung von Verteilung und Funktion der Proteine in der Plasmamembran

Alle Behandlungen erfolgen an isolierten PM und an ganzen Zellen, deren Membranen anschliessend isoliert werden. Die Proteine werden mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, die Gele getrocknet und bei Versuchen mit radioaktiven Isotopen auf Röntgenfilmen wie oben beschrieben exponiert.

### 2.4.1 $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase (nach Marchalonis et al., 1971)

Ganze Zellen oder isolierte PM werden in 40 mM Phosphatpuffer (pH 6,7) mit 20 mM KCl und 5 mM  $\text{MgCl}_2$  suspendiert (PAD-Solution nach Newell und Sussman, 1969). Die Lösung enthält ausserdem 5 mM Glukose und 5  $\mu\text{g/ml}$  Glukoseoxidase (Calbiochem) zur Erzeugung von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 20  $\mu\text{g/ml}$  Lactoperoxidase (Calbiochem), 0,5  $\mu\text{M}$  NaI und 0,4 mCi  $\text{Na}^{125}\text{I}$  (100 mCi/ml, Amersham). Die Zugabe des radioaktiven  $\text{Na}^{125}\text{I}$  löst die Markierung aus. Nach 20 min bei Zimmertemperatur wird die Reaktion durch Verdünnen mit 3,3 mM NaI in PAD und Sedimentieren des markierten Materials gestoppt.

### 2.4.2 5-( $^{125}\text{I}$ )-Iodonaphthylazid (Bercovici und Gitler, 1978)

Die Substanz (INA, 2,5 Ci/mMol) wurde von T. Bercovici am Weizmann Institut in Israel synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

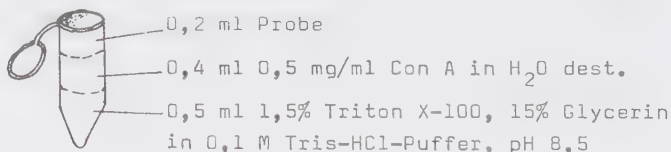
Eine Suspension von ganzen Zellen oder isolierten PM in PAD-Solution (Newell und Sussman, 1969) wird bei Rotlicht mit 15  $\mu\text{Ci}$   $^{125}\text{I}$ INA markiert. Da die Substanz sehr hydrophob ist, löst sie sich in der Lipidschicht der PM. Durch Belichtung der Probe mit UV-Licht während 5 min spaltet das Azid  $\text{N}_2$  ab, und das entstehende Nitren bildet kovalente Bindungen mit umgebenden Molekülen, also Lipiden und intrinsischen Membranproteinen. Die Reaktion wird durch Verdünnen und Waschen mit Phosphatpuffer gestoppt.

#### 2.4.3 ( $^{14}\text{C}$ )-Dinitrofluorbenzol, DNFB (Sievers et al., 1978)

Ganze Zellen und isolierte PM werden in Suspension in 15 mM Phosphatpuffer von pH 7 markiert mit 5  $\mu\text{Ci/ml}$   $^{14}\text{C}$ -DNFB (1-Fluoro-2,4-dinitro( $^{14}\text{C}$ )-Benzol, 21 mCi/mMol, Amersham). Nach 5 min wird die Suspension verdünnt und das Material mit Phosphatpuffer gewaschen.

#### 2.4.4 ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-Adenosintriphosphat, ATP (nach King und Frazier, 1977)

Ganze Zellen werden auf einem Magnetrührer bei einer Dichte von  $5 \times 10^7/\text{ml}$  in 17 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 1 mM  $\text{MgSO}_4$  in Suspension gehalten. Durch Zugabe von 10-15  $\mu\text{Ci/ml}$  ( $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP (Amersham, 20 Ci/mMol) wird die Markierung gestartet. Proben von 200  $\mu\text{l}$  werden alle 45 sec entnommen und in folgendermassen vorbereitete Plastikgefässe pipettiert:



Die Gefässe werden 10 sec bei 10'000 g in einer Microfuge B (Beckman) zentrifugiert. Während des Sedimentierens der Zellen erfolgt eine Stabilisierung der PM durch Con A und die anschliessende Lyse der Zellen in Triton X-100. Die im Sediment angereicherten Ghosts werden in "Sample Buffer" für die Gelelektrophorese gelöst.

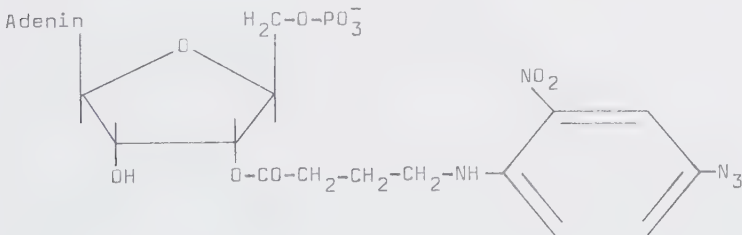
#### 2.4.5 Markierungen zur Identifizierung von ATP- bzw. AMP-bindenden Proteinen (Lauquin et al., 1978)

Die lichtsensitiven ATP- bzw. AMP-Analogen N-4-Azido-2-nitro-

phenyl-aminobutyryl-ATP und N-4-Azido-2-nitrophenyl-amino-butyryl-AMP (Fig.2) wurden im Labor von P.V. Vignais in Grenoble synthetisiert und uns freundlicherweise zur Verfügung gestellt. Die spezifische Aktivität des  $^3\text{H}$ -ATP-Analogen betrug ca. 180 mCi/mMol, die des  $^3\text{H}$ -AMP-Analogen ca. 320 mCi/mMol.

Suspensionen von Myxamöben oder isolierten PM in 17 mM Phosphatpuffer (pH 7,0) mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$  werden bei Rotlicht mit der lichtsensitiven Substanz gemischt. Pro Ansatz verwendet man 2,5  $\mu\text{Ci}$  des AMP-Analogen oder 5-7  $\mu\text{Ci}$  des ATP-Analogen und im Kontrollversuch 17  $\mu\text{Ci}$  des ungekoppelten N-4-Azido-2-nitrophenyl-Aminobutyrrats (225 mCi/mMol). Die Proben werden im Rollerkultur-Rotor mit einem 250 W Scheinwerfer aus einer Mindestdistanz von 10 cm während 30 min im Kühlraum bei  $4^\circ\text{C}$  belichtet. Eine Verdünnung mit Puffer und anschliessendes Zentrifugieren stoppen die Reaktion.

Fig.2 Strukturformel von N-4-Azido-2-nitrophenyl-amino-butyryl-AMP



#### 2.4.6 Fluorescamin (nach Cross und Briggs, 1977)

Eine Lösung von 40 mg/ml Fluorescamin (Sigma) in Aceton wird zur Suspension von Zellen oder PM in 20 mM Phosphatpuffer (pH 7,4) gegeben, bis eine Endkonzentration von 0,4-1,2 mg/ml erreicht ist. Nach 1-2 min wird die Suspension verdünnt und

das Material durch Zentrifugation gewaschen. Nach der Elektrophorese werden die Gele unter UV-Licht fotografiert.

## 2.5 Messung von Enzymen und Proteinkonzentrationen

### 2.5.1 Alkalische Phosphatase

(leicht modifiziert nach Bergmeyer, 1970)

Die Substratlösung setzt sich aus 0,2mg/ml p-Nitrophenylphosphat (Fluka) und 10 mM  $MgCl_2$  in 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 8,5) zusammen. 0,5 ml dieser Lösung und 50  $\mu$ l Enzymextrakt werden während 1-2 h bei 37°C inkubiert. Die Reaktion wird durch Zugabe von 2 ml 0,2 M  $Na_2CO_3$  gestoppt. Die Extinktion des freigesetzten p-Nitrophenols lässt sich im Spektrophotometer bei 400 nm bestimmen.

### 2.5.2 Saure Phosphatase

Die Messung erfolgt wie für die Alkalische Phosphatase beschrieben, jedoch in 0,1 M Citratpuffer, pH 5,0.

### 2.5.3 $\alpha$ -Mannosidase

Das Vorgehen ist das selbe wie bei den Phosphatasen. Die Substratlösung enthält 0,4 mg/ml p-Nitrophenyl- $\alpha$ -D-Mannopyranosid (Fluka) in 0,1 M Citratpuffer, pH 5,0.

### 2.5.4 $\beta$ -N-Acetyl-Glucosaminidase

Das Enzym wird ebenfalls nach der oben beschriebenen Methode bestimmt. Die Substratlösung enthält 0,2 mg/ml p-Nitrophenyl-N-Acetyl- $\beta$ -D-Glucosaminid (Fluka) in 0,1 M Citratpuffer, pH 5,0.

#### 2.5.5 Malatdehydrogenase, MDH (Bergmeyer, 1970)

Die Reaktion wird in der Spektrometer-Küvette direkt verfolgt, indem man für jede Enzymprobe eine Aktivitätskurve aufnimmt.

Man mischt in einer 2 ml Küvette mit 1 cm Schichtdicke:

- 1 ml 0,1 M Tris-HCl-Puffer (pH 7,4) mit 5 mM  $\text{MgCl}_2$
- 50  $\mu\text{l}$  NADH (1 mg/ml, Boehringer)
- 20  $\mu\text{l}$  Oxalacetat (16 mg/ml, Boehringer)
- 5  $\mu\text{l}$  Enzymprobe

Die Oxidation des NADH wird bei 340 nm verfolgt.

#### 2.5.6 NADPH-Oxidase (Bergmeyer, 1970)

Das Enzym wird mit der für die MDH beschriebenen Technik gemessen. Als Elektronenakzeptor dient Dichlorophenol-Indophenol.

#### 2.5.7 ATP'ase/ADP'ase

Das Inkubationsmedium besteht aus:

- 20 mM Tris-Maleat-Puffer, pH 7,0
- 5 mM  $\text{MgCl}_2$
- ca. 50 nCi (Adenin-U- $^{14}\text{C}$ )-Adenosin-5'-Triphosphat,  
 $\text{NH}_4^+$ - Salz (275 mCi/mMol; Amersham)

Die Fraktionen aus den Dichtegradienten werden zur Entfernung der Saccharose gegen den Inkubationspuffer dialysiert. 100  $\mu\text{l}$  der dialysierten Proben werden mit je 1  $\mu\text{l}$   $^{14}\text{C}$ -ATP ( $\approx$  50 nCi) 4-10 min bei Zimmertemperatur inkubiert. Die Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Aceton von  $-15^\circ\text{C}$  stoppt die Reaktion. Die Proben werden einige Stunden bei  $-17^\circ\text{C}$  aufbewahrt und anschliessend zur Entfernung der ausgefallenen Proteine 2 min bei 10'000 g zentrifugiert (Beckman, Microfuge B). Die Auftrennung der Ueberstände erfolgt auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten mit einem Laufmittel aus 0,25 M LiCl in 3%-iger Ameisensäure. Die Radioaktivität in ATP, ADP und AMP wird mit einem Detektor (Bethold Dünnschichtscanner, Camlab Ltd., Cambridge) festgestellt. Der Anteil des abgebauten ATP in Prozent der aufgetragenen Radioaktivität dient als Mass für die Aktivität der ATP'ase. Da auch ADP und AMP gut getrennt werden, kann im gleichen Versuch die ADP'-ase-Aktivität bestimmt werden.

#### 2.5.8 cAMP-Phosphodiesterase

Die Reaktion wird in 20 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 7,0) mit 5 mM  $MgCl_2$  durchgeführt. Die Fraktionen aus Dichtegradienten werden vor der Messung gegen den Inkubationspuffer dialysiert. Ein Ansatz besteht aus 200  $\mu l$  Puffer mit 1  $\mu Ci$   $^3H$ -cAMP ( $(8-^3H)$ Adenosine-3', 5'-cyclic Phosphate, Ammonium salt; 26 Ci/mMol; Amersham) und 50  $\mu l$  der dialysierten Fraktion. Die Inkubation erfolgt bei Zimmertemperatur. Nach 6, 20 und 60 min entnimmt man dem Ansatz ein Aliquot von 50  $\mu l$ , stoppt mit 50  $\mu l$  eisgekühltem Aceton und hält die Proben während einiger Stunden bei  $-17^\circ C$ . Die ausgefallenen Proteine werden in der Beckman Microfuge 8 während 1 min bei 10'000 g sedimentiert. Zufügen von 5  $\mu l$  0,1 mM EDTA (pH 7,0) zum Ueberstand verbessert die nachfolgende Auftrennung von Substrat (cAMP) und Produkt (AMP) auf PEI-Cellulose-Dünnschichtplatten. Das Laufmittel besteht aus n-Butanol, Aceton, Essigsäure,  $NH_3$  conc. und  $H_2O$  im Verhältnis 14:10:6:1:8 (Rossomando und Sussman, 1972). Aus jedem Ansatz werden 30  $\mu l$  ( $\approx$  ca. 100'000 dpm  $^3H$ ) aufgetragen. Die Radioaktivität in cAMP und AMP wird mit einem Detektor (Berthold Dünnschichtscanner, Camlab Ltd., Cambridge) festgestellt. Der Anteil des abgebauten  $^3H$ -cAMP in Prozent der aufgetragenen Radioaktivität dient als Mass für die Aktivität der cAMP-Phosphodiesterase.

#### 2.5.9 Adenylylcyclase (modifiziert nach Salomon et al., 1974)

Das Inkubationsmedium setzt sich zusammen aus:

37 mM Tris-HCl-Puffer, pH 7,8

20 mM DTT (Sigma)

10 mM  $MgCl_2$

1 mM cAMP (Sigma)

0,5 mM ATP (Sigma)

10 mM Kreatinphosphat (Boehringer)

20-30 U/ml Kreatinkinase (Boehringer)

pro 100  $\mu l$ -Ansatz ca. 2  $\mu Ci$  Adenosin ( $\alpha^{32}P$ ) Triphosphat, Na-Salz, 12-20 Ci/mMol (Amersham)

Die Reaktion wird durch Zugabe von 50-350  $\mu\text{g}$  Protein zu einem Ansatz von 100  $\mu\text{l}$  gestartet. Die Inkubation dauert 10 min bei Zimmertemperatur und wird durch Zugabe von 100  $\mu\text{l}$  Stopplösung, bestehend aus 2% SDS, 40 mM ATP und 1 mM cAMP in 25 mM Tris-HCl (pH 7,5) beendet. Damit die Ausbeute an  $^{32}\text{P}$ -cAMP während der nachfolgenden Reinigung überprüft werden kann, gibt man als internen Standard ca. 50'000 cpm  $^3\text{H}$ -cAMP in 800  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  dest. zu jedem Ansatz.

Das Gemisch wird auf eine erste Säule (0,5 x 15 cm) aufgetragen, die mit 1 ml DOWEX AG 50 WX 8, 200-400 mesh, beschickt ist. Es wird zweimal mit je 1 ml dest.  $\text{H}_2\text{O}$  gespült. Die Eluate werden verworfen. Mit weiteren 3 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. wird das Produkt der Reaktion, cAMP, direkt auf eine zweite Säule (0,4 x 10 cm, Pasteur-Pipette) gespült. Diese enthält 0,6 g neutrales Aluminiumoxid (Woelm, Eschwege) der Aktivitätsstufe I, das zuvor mit 8 ml 0,1 M Imidazol-HCl-Puffer pH 7,5 gewaschen wurde. Das Eluat wird verworfen. Die zweite Säule wird nun mit 4 ml Imidazol-Puffer gewaschen, das Eluat in Szintillationsgefäßen aufgefangen und mit 12 ml Aquasol (New England Nuclear) gemischt. Der Gehalt an  $^{32}\text{P}$ - und  $^3\text{H}$ -cAMP wird in einem Nuclear Chicago Isocap 300 Szintillationszähler gemessen. Die Ausbeute an cAMP kann auf Grund der  $^3\text{H}$ -counts errechnet werden und beträgt 50-70%. Als Blindwert dient ein Kontrollansatz, bei dem die Stopplösung vor der Inkubation zugegeben wird. Von den eingesetzten  $3-4 \times 10^6$  cpm ( $\alpha$ - $^{32}\text{P}$ )-ATP finden sich 5-15 cpm oder 0,0005% in der cAMP-Fraktion.

Nach jedem Experiment werden die DOWEX-Säulen durch Zugabe von 2 ml 1 N HCl regeneriert. Vor dem nächsten Gebrauch wäscht man die Säulen mit 10 ml  $\text{H}_2\text{O}$  dest. Die Säulen mit Aluminiumoxid werden vor jedem Experiment mit 8 ml 0,1 M Imidazol-HCl-Puffer von pH 7,5 gewaschen.

#### 2.5.10 Proteinbestimmung

Alle Proteinkonzentrationen werden nach der Methode von Lowry et al. (1951) bestimmt. Als Standardwerte dienen Lösungen mit Rinderserumalbumin (Fluka).

### 3. R E S U L T A T E

#### 3.1 Proteine und Glykoproteine der Plasmamembran

Die PM von *P. pallidum* lässt sich nach der von Parish und Müller (1976) für *D. discoideum* beschriebenen Methode isolieren (s. auch Philippi, 1978). Es entstehen ebenfalls Membran-Ghosts, deren Reinheit im Phasenkontrastmikroskop überprüft werden kann. Wird ein Sediment mit gewaschenen Ghosts im Elektronenmikroskop untersucht, sind vorwiegend Membranen zu beobachten (Fig. 3). Grössere PM-Stücke sind oft paarweise zusammengefügt; wahrscheinlich wird dies durch Con A-Brücken verursacht. Die kleineren Fragmente liegen als Vesikeln vor (De Pierre und Karnovsky, 1973).

Die Auftrennung der PM mittels Gelelektrophorese (s. 2.3) gibt Aufschluss über die wichtigsten enthaltenen Proteine und Glykoproteine mit Molekulargewichten zwischen 10 und ca. 300 kd. Einige Proteine sind eventuell Untereinheiten grösserer Komplexe, die durch SDS dissoziiert werden.

Fig. 4a zeigt das Proteinmuster der PM von *P. pallidum*. Die Zellen befanden sich am Ende der Wachstumsphase. Ein Vergleich dieses Musters mit jenem einer Membranpräparation von *D. discoideum* (Fig. 4b) ergibt eine Uebereinstimmung der beiden Arten in den Hauptproteinen der PM. Auffällig sind die Banden von Myosin (2 schwere Ketten, meist nur als eine Bande mit 210 kd), Aktin (42 kd) und Con A (27 kd), das zur Isolierung der PM verwendet wird. Das Vorkommen von Aktin und Myosin wurde bei *D. discoideum* schon von Clarke und Spudich (1974) beschrieben. Parish et al. (1977a) stellten die Assoziierung dieser Proteine mit der PM von *D. discoideum* fest. Aktin und Myosin sind also auch bei *P. pallidum* mengenmässig wichtige Bestandteile der PM.

Unterhalb von Con A findet sich eine schwächere Proteinbande mit einem MG von ca. 26 kd. Sie ist nicht in allen Gelen von der dicken Con A-Bande getrennt. Es handelt sich wahrscheinlich um "Pallidin", ein lektinartiges Protein mit

Affinität zu D-Galaktose, das von Simpson et al. (1975) aus *P. pallidum* isoliert wurde. Die Autoren geben das MG der Untereinheit von Pallidin mit  $24800 \pm 1100$  an. Auch Discoidin, ein lektinartiges Potein von *D. discoideum* (Rosen et al., 1973), tritt in der PM-Fraktion auf (Parish und Schmidlin, 1979a).

Auch im Glykoproteinmuster der PM von *P. pallidum* und *D. discoideum* finden sich gemeinsame Banden (Fig. 5). Im Bereich oberhalb von Aktin ist es jedoch schwierig, direkte Uebereinstimmungen nachzuweisen, da hier viele Proteine mit leicht verschiedenen MG eng beieinander liegen.

Eine Anreicherung von PM lässt sich auch durch fraktioniertes Zentrifugieren eines Homogenats erreichen. Fig. 5d zeigt das Glykoproteinmuster einer 150 S-Fraktion (s. 2.2.3) von *P. pallidum*. Es stimmt in den Hauptbanden mit dem Muster von isolierten PM überein, weist aber auch zusätzliche Banden auf. Aehnliche Resultate ergeben sich aus Gelen, die mit Amidoschwarz gefärbt sind (Fig. 6). Die 150 S-Fraktion enthält also vorwiegend, aber nicht ausschliesslich, PM. Dies wird durch enzymatische Untersuchungen bestätigt (s. 3.3.3.4). Das fraktionierte Zentrifugieren ist aber zeitraubend und eignet sich deshalb nicht als Routinemethode zur Isolierung von PM. Auch ist die Ausbeute zu gering.

Membran-Ghosts entstehen auch durch die Behandlung von Myxamöben mit Digitonin (Riedel und Gerisch, 1968; s. 2.2.1.2). Fig. 6 zeigt einen Vergleich solcher Ghosts mit Con A/Triton-Membranen. Die Protein- und Glykoproteinmuster (Fig. 5) stimmen gut überein; es fallen jedoch Unterschiede in der Konzentration einzelner Banden auf. Dies betrifft v.a. Aktin und Myosin, deren Konzentration in den Digitonin-Ghosts geringer ist. Digitonin scheint diese beiden Proteine von der PM zu befreien. Diese Vermutung wird durch eine Beobachtung von Parish (unveröffentlicht) unterstützt, der festgestellt hat, dass eine Digitoninbehandlung den Aktomyosin Gehalt von isolierten Con A/Triton-Ghosts herabsetzt.

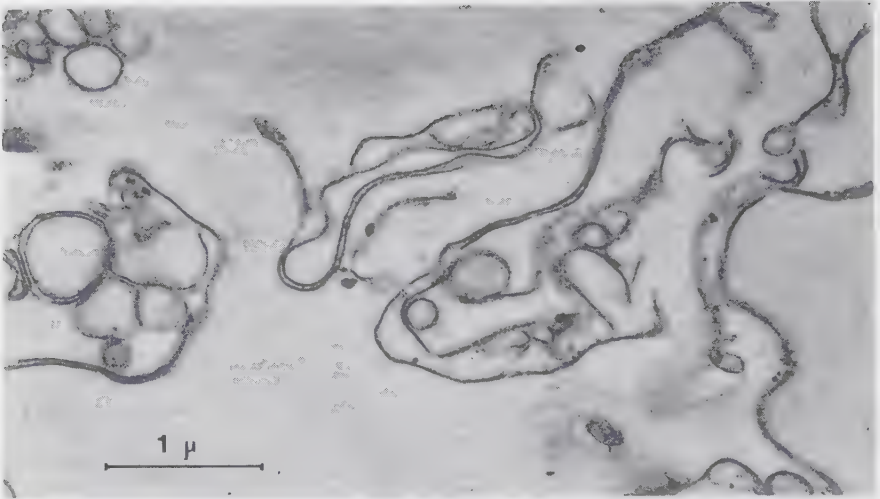


Fig. 3a PM-Fraktion von *P. pallidum* x30'000  
(EM-Aufnahme: M. Philippi)



Fig. 3b PM-Fraktion von *P. pallidum* x150'000  
(EM-Aufnahme: M. Philippi)

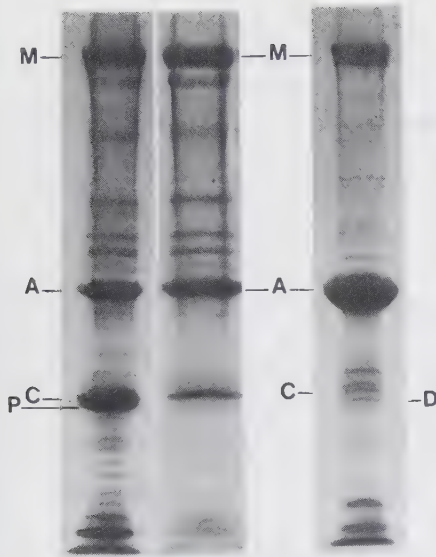


Fig. 4a

4b

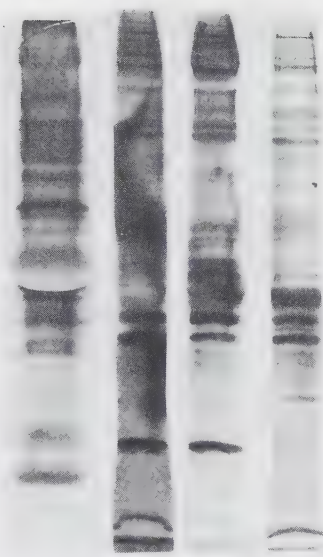


Fig. 5a b

c

d

Fig. 4 Proteinmuster der PM-Fractionen von *P. pallidum* (4a, zwei Präparationen) und *D. discoideum* (4b). A= Aktin (42 kd); C= Con A (27 kd); D= Discoidin (26 kd); M= schwere Ketten des Myosins (210 kd); P= Pallidin (26 kd)

Fig. 5 Glykoproteinhmuster der PM-Fractionen von *D. discoideum* (5a) und *P. pallidum* (5b-d). Die Fractionen von *P. pallidum* sind Resultate von 3 verschiedenen Methoden:  
5b Präparation mit Digitonin  
5c Präparation mit Con A und Triton X-100  
5d Präparation durch Zentrifugation, 150 S-Fraktion (s. Text)

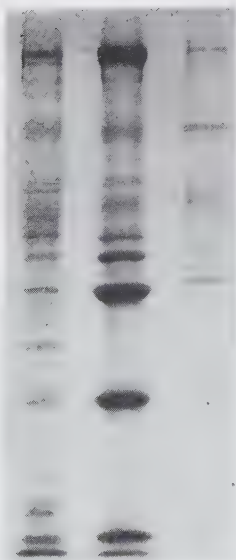


Fig. 6 Proteinmuster der PM von *P. pallidum*  
a Digitonin-Ghosts  
b Con A/Triton-Ghosts  
c 150 S-Fraktion

Fig. 6

Die PM-Isolierungsmethode mit Con A und Triton hat sich als einfach und reproduzierbar erwiesen. Sofern nichts anderes angegeben ist, stammen alle im folgenden beschriebenen Resultate aus Untersuchungen, bei denen die PM nach dieser Methode isoliert wurde.

### 3.2 Topografie der Plasmamembran

Die im folgenden beschriebenen Resultate stammen von Zellen, die ihr Wachstum abgeschlossen haben, sich also in der stationären Phase befinden.

Die einzelnen Proteine werden nach ihrem MG (im 10% Acrylamidgel, s. 2.3.4) benannt, sofern es sich nicht um bekannte Proteine wie Aktin und Myosin handelt. Wenn eine Uebereinstimmung mit einem später wieder erwähnten Protein vermutet wird, ist seine Nummer aus Tab. 4 (S. 56) in Klammern beigelegt.

#### 3.2.1 Proteine der Zelloberfläche (PM-Aussenseite)

Alle Methoden zur Markierung der Zelloberfläche werden auf ganze Myxamöben angewandt. Deren PM wird nach der Markierung isoliert (s. 2.2.1.1). Bei Kontrollversuchen, in denen isolierte PM als Akzeptoren für die Markierungssubstanzen dienen, werden immer alle Proteine markiert, die in deutlich feststellbarer Menge in der PM vorkommen, unter anderen auch Aktin und Myosin. Diese Resultate werden nicht im einzelnen dargestellt.

##### 3.2.1.1 $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase

Die Lactoperoxidase katalysiert in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und NaI die Iodierung von Tyrosinresten in Proteinen. Da das Enzym nicht in ganze Zellen eindringen kann, werden nur

die Proteine der Zelloberfläche iodiert (Marchalonis et al., 1971). Die nach dieser Methode mit  $^{125}\text{I}$  markierten Proteine müssen also wenigstens teilweise auf der PM-Aussenseite liegen, und der exponierte Teil enthält Tyrosin.

Auf Autoradiogrammen können 8 deutliche Banden festgestellt werden (Fig. 7a). Die stärksten Markierungen finden sich in zwei Proteinen mit einem MG von 41 kd (direkt unterhalb von Aktin, Nr. 19 in Tab. 4) und 26 kd (Stelle von Pallidin, ev. 2 Proteine, Nr. 9 und 10 in Tab. 4).

Knapp unterhalb der starken Bande mit 41 kd findet sich noch eine schwächere im Bereich von 39 kd. Die Position im Gel stimmt mit einem Protein überein, das während der ganzen Differenzierung Fukose einbaut (Nr. 18 in Tab. 4).

Die drei Banden oberhalb von Aktin entsprechen drei deutlich erkennbaren Proteinen, die Molekulargewichte von 51, 57 und 70 kd aufweisen (Tab. 4: Nr. 1, 14 und 12). Die zwei obersten Markierungen befinden sich im Bereich von 90-100 kd. Die untere, stärkere, entspricht wahrscheinlich dem Protein mit 92 kd (Nr. 11 in Tab. 4).

Neben diesen deutlichen Banden treten diffuse Schwärzungen im Autoradiogramm auf, so dass mit einigen zusätzlichen tyrosinhaltigen Proteinen an der Zelloberfläche gerechnet werden muss.

### 3.2.1.2 $^{14}\text{C}$ -Dinitrofluorbenzol (DNFB)

Alle mit  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase festgestellten Proteine finden sich auch auf Autoradiogrammen von  $^{14}\text{C}$ -DNFB-Versuchen (Fig. 7d). Auffällig ist jedoch, dass hier die Intensität der Markierung einzelner Proteine stark von jener der Iodierung abweicht (vgl. die Banden von 26 kd oder 92 kd). Dies ist verständlich, wenn man bedenkt, dass die Markierungssubstanzen Affinitäten zu ganz verschiedenen chemischen Gruppen besitzen: DNFB bindet an  $-\text{NH}_2$ ,  $-\text{SH}$ , phenolischen  $-\text{OH}$  und Imidazol  $>\text{NH}$  Gruppen (Dawson et al., 1969), Iod

hingegen nur an Tyrosin (Marchalonis et al., 1971).

Deutliche Banden, die zusätzlich zu den bei der Iodierung beschriebenen auftreten, liegen im Bereich der Molekulargewichte von 29 kd, 34 kd ( $\approx$  Protein 2 in Tab. 4), 48 kd, 65 kd und 77 kd.

In höheren Bereichen wird die Schätzung des MG ungenauer; es werden deshalb nur noch Banden erwähnt, bei denen eine Übereinstimmung mit Proteinen vermutet wird, denen im weiteren Verlauf der Arbeit eine Bedeutung zukommt. Die etwas diffuse Bande im Bereich von 110 kd entspricht wahrscheinlich dem Glykoprotein Nr. 15 (Tab. 4), das im Laufe der Zelldifferenzierung intensiv synthetisiert wird (s. 3.4.1 und 3.4.2), stark antigenisch wirkt und mit Butanol extrahiert werden kann (s. 3.4.3). Ferner ist das Protein mit 180 kd von Interesse. Seine Position im Gel stimmt mit jener des stärksten Antigens vegetativer PM überein (s. 3.4.3).

### 3.2.1.3 Fluorescamin

Wird dieser Fluoreszenzfarbstoff in einer Konzentration von 0,4 mg/ml auf intakte Zellen angewendet, so ist das Markierungsmuster mit jenem von  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase vergleichbar (Fig. 7c). Gemeinsame Banden der beiden Methoden finden sich bei folgenden MG-Bereichen: 26, 39, 41, 51, 57, 70 und 92 kd. Da mit  $^{14}\text{C}$ -DNFB unter anderen auch die iodierten Proteine markiert werden, sind diese 7 Proteine mit allen drei Methoden nachweisbar, also mit grosser Wahrscheinlichkeit an der Zelloberfläche exponiert.

Andere Stellen im Gel zeigen nach Fluorescamin-Behandlung diffuse Fluoreszenzflecken, so z.B. die Regionen von Con A, Aktin und Myosin. Bei höherer Konzentration von Fluorescamin (1,2 mg/ml) werden diese Stellen deutlicher markiert, und es treten zusätzliche Banden auf (Fig. 7b). Dies lässt vermuten, dass Fluorescamin nicht ausschliesslich mit Oberflächenproteinen reagiert, sondern auch in die PM eindringen kann (s. Diskussion 4.2).

### 3.2.2 Integrierte PM-Proteine

Das stark hydrophobe Molekül ( $^{125}\text{I}$ )-5-Iodonaphthylazid (INA) markiert nach Bercovici und Gitler (1978) Proteine, die in der Lipiddoppelschicht biologischer Membranen verankert sind, also sogenannte integrierte Membranproteine.

Werden ganze Zellen mit INA behandelt, finden sich nur 6 Banden im Autoradiogramm (Fig. 7g). Sie entsprechen Proteinen mit Molekulargewichten von 26, 41, 92, 98, 180 und ca. 250 kd. Die ersten vier werden auch von aussen mit  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase,  $^{14}\text{C}$ -DNFB und Fluorescamin markiert, die beiden grössten Proteine nur mit DNFB. Alle sechs Proteine sind also wahrscheinlich in der Lipidschicht verankert und ragen mit einem Teil der Polypeptidkette nach aussen.

Werden statt ganzer Zellen isolierte PM mit INA behandelt, treten zusätzliche Banden auf (Fig. 7h). Dies ist eigentlich nicht zu erwarten, kann aber durch folgende Ueberlegungen verständlich gemacht werden:

- 1) Zur Isolierung der PM wird Triton verwendet. Das Detergenz bindet Lipide und lipophile Proteine und könnte deren räumliche Anordnung in der PM verändern. Dadurch würden weitere Proteine für INA zugänglich.
- 2) Globuläre Proteine oder solche, die in vivo in Aggregaten vorliegen, wie z.B. Aktin und Myosin, weisen wahrscheinlich grosse hydrophobe Bereiche auf, so dass sich INA dort intramolekular einlagern kann. Diese Bereiche müssen nicht unbedingt in die Lipidschicht eingebettet sein; sie sind auch bei Proteinen vorstellbar, die der cytoplasmatischen Seite der PM angelagert sind.

Die stärksten Banden, die bei Behandlung isolierter PM zusätzlich entstehen, entsprechen Proteinen mit folgenden MG: 24 kd (Nr. 3 in Tab. 4), 27-28 kd, 42 kd (Aktin), ca. 110 und 120 kd und 210 kd (Myosin). Das Protein mit 110 kd ist wahrscheinlich identisch mit dem starken Antigen (Nr. 15 in Tab. 4), das möglicherweise ein Zellkontaktprotein ist (s. 4.6.2). Die

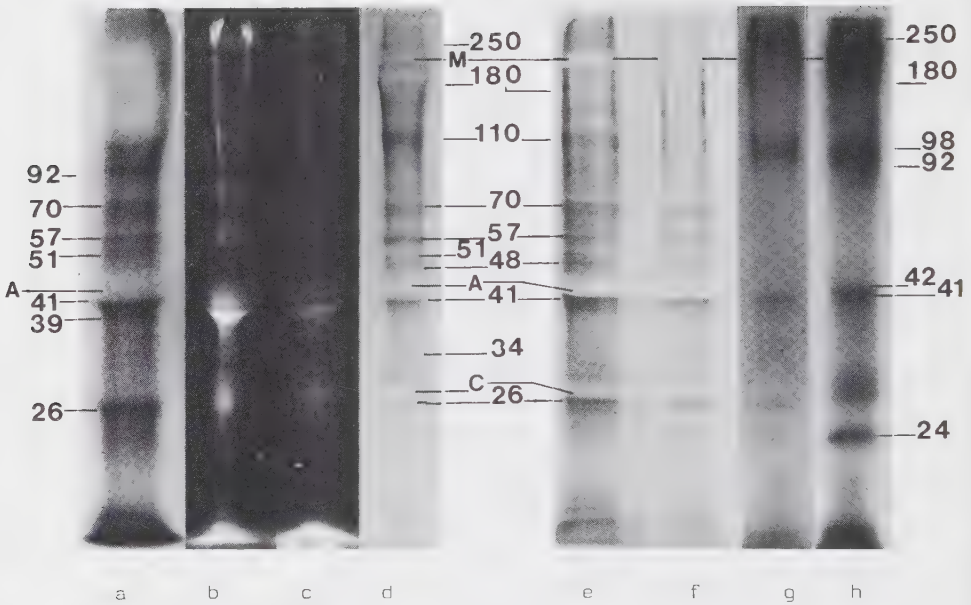


Fig. 7 Markierungen zur Aufklärung der Topografie der PM von *P. pallidum*. A= Aktin (42 kd), C= Con. A (27 kd), M= Myosin (210 kd). Die Zahlen in der Abbildung sind MG-Angaben in kd.

- a)  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase, Autoradiogramm
- b) Fluorescamin, 1,2 mg/ml, Fotografie unter UV-Licht von 254 nm
- c) Fluorescamin, 0,4 mg/ml, fotografiert wie oben
- d)  $^{14}\text{C}$ -DNFB, Autoradiogramm
- e)  $^3\text{H}$ -NAP<sub>4</sub>, Autoradiogramm
- f)  $^3\text{H}$ -NAP<sub>4</sub> mit 0,1 mM Suramin, Autoradiogramm
- g)  $^{125}\text{I}$ NA, Behandlung intakter Zellen, Autoradiogramm
- h)  $^{125}\text{I}$ NA, Behandlung isolierter PM, Autoradiogramm

obere Bande mit ca. 120 kd entspricht nicht dem Protein 21 (Tab. 4). Dieses weist zwar ein ähnliches MG auf, wird jedoch erst ab Mitte der Aggregationsphase in die PM eingebaut (s. 3.4.1).

### 3.2.3 Versuche zur Markierung von ATP- und AMP-bindenden Proteinen in der PM

Für die Versuche mit *P. pallidum* werden die lichtsensitiven Substanzen  $\text{NAP}_4$ -ATP,  $\text{NAP}_4$ -AMP und das freie  $\text{NAP}_4$  verwendet (s. 2.4.5).  $\text{NAP}_4$  ist in allen Fällen mit  $^3\text{H}$  markiert.

Werden intakte Zellen behandelt, ergeben sich nur mit freiem  $\text{NAP}_4$  deutliche Markierungen. Das mit  $\text{NAP}_4$  in der PM erzeugte Markierungsmuster (Fig. 7e) ist jenem ähnlich, das bei Behandlung ganzer Zellen mit DNFB entsteht (s. 3.2.1.3). Die übereinstimmenden Markierungen betreffen die Banden mit folgendem MG: 26, 29, 39, 41, 48, 51, 57, 65, 77 und 110 kd. Dies lässt vermuten, dass fast alle nach aussen orientierten Proteine der PM von  $\text{NAP}_4$  angegriffen werden.

Die Behandlung von isolierten PM führt bei allen drei  $\text{NAP}_4$ -Molekülen zu einer vielfältigen Markierung (Fig. 8). Alle drei Muster sind sich aber so ähnlich, dass die Spezifität der Bindung sicher nicht nur vom ATP- oder AMP-Rest des Moleküls bestimmt wird. Vielmehr muss angenommen werden, dass  $\text{NAP}_4$  selber auch eine Affinität zu verschiedenen PM-Proteinen besitzt. Interessanterweise kann diese Affinität von einem Hemmstoff für ATP'asen (Suramin; Fortes et al., 1973) und von ATP und ADP beeinflusst werden (Fig. 7f und 8). Suramin setzt die Intensität der Markierung bei fast allen Banden und bei allen drei Substanzen herab, die Hemmung ist aber nicht bei allen Banden gleich stark. So ist z.B. die Bindung der drei Moleküle an das Protein mit 41 kd empfindlich auf Suramin.

Die Effekte von ATP und ADP sind an Aktin und Myosin besonders deutlich zu sehen. Beide Proteine werden von aussen mit keinem der drei  $\text{NAP}_4$ -Moleküle markiert. Bei Behandlung von

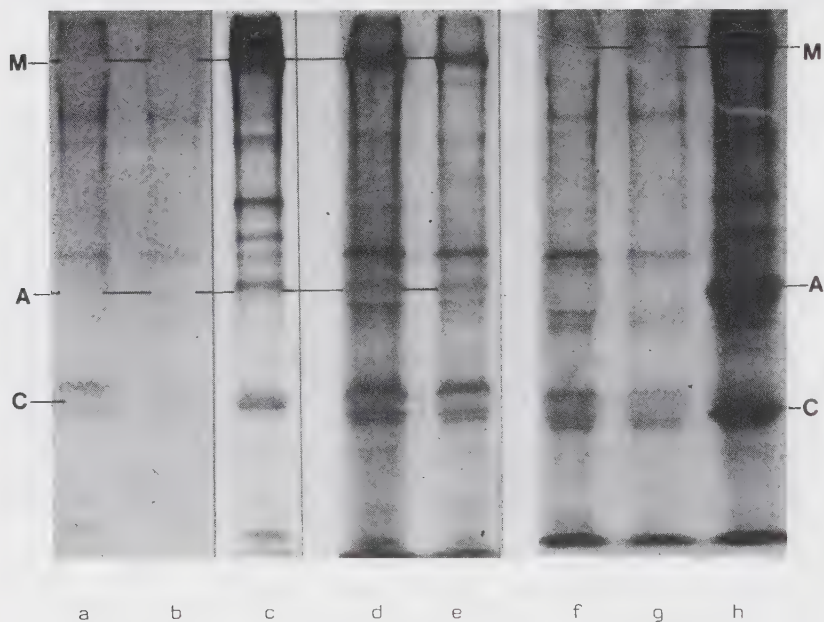


Fig. 8 Markierungen isolierter PM von *P. pallidum* mit lichtsensitiven AMP- und ATP-Analogen; Autoradiogramme. A= Aktin, C= Con A, M= Myosin

a-c sind Kontrollmarkierungen mit ungekoppeltem  $^3\text{H-NAP}_4$

- a)  $\text{NAP}_4$  ohne Zusatz
- b)  $\text{NAP}_4$  mit 0,1 mM Suramin
- c)  $\text{NAP}_4$  mit 10 mM ATP
- d)  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  ohne Zusatz
- e)  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  mit 0,1 mM Suramin
- f)  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  ohne Zusatz
- g)  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  mit 0,1 mM Suramin
- h)  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  mit 10 mM ADP

isolierten PM ist die Markierung mit  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  am deutlichsten. Der ATP-Rest scheint in diesem Fall für die Bindung verantwortlich zu sein. Dass ATP von Aktomyosin gebunden und gespalten wird, ist aus verschiedenen Systemen bekannt (Mannherz und Goody, 1976). Werden isolierte PM in Anwesenheit von 10 mM ATP mit freiem  $\text{NAP}_4$  behandelt, wird die Markierung von Aktin und Myosin wesentlich verstärkt. Dies trifft auch für einige weitere Banden zu (Fig. 8c). Noch drastischer wirkt sich der Zusatz von 10 mM ADP bei der Markierung isolierter PM mit  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  aus: Aktin und Myosin werden ohne Zusatz kaum markiert, jedoch sehr intensiv bei Zugabe von ADP. Auch hier zeigt sich der gleiche Effekt an mehreren Banden (Fig. 8h). Adeninnukleotide beeinflussen also die Konformation verschiedener PM-Proteine, u.a. Aktin und Myosin, so dass die Bindungsaffinitäten dieser Proteine zu  $\text{NAP}_4$  und  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  wesentlich gesteigert werden (s. Diskussion 4.3).

#### 3.2.4 Zusammenfassung der Versuche zur Topografie der PM

Da die Experimente nur mit Zellen der stationären Phase (Fig. 1) durchgeführt worden sind, kann die Orientierung der erst in späteren Phasen auftretenden Proteine nicht beurteilt werden.

In Tabelle 1 sind die Resultate der fünf Markierungsmethoden zusammengefasst. Daraus geht folgendes hervor:

- 1) 7 Proteine lassen sich mit allen 4 oder mindestens drei der angewendeten Methoden zur Markierung von Proteinen der PM-Aussenseite nachweisen. Die 7 Proteine haben Molekulargewichte von 26, 39, 41, 51, 57, 70 und 92 kd.
- 2) 6 weitere Proteine werden mit zwei der angewendeten Methoden von aussen markiert. Sie haben Molekulargewichte von 29, 48, 65, 77, 98 und 110 kd. Ausser dem Protein mit 98 kd, das mit  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase und  $^{14}\text{C}$ -DNFB nachgewiesen wird, können alle Vertreter dieser Gruppe mit DNFB und  $\text{NAP}_4$  markiert werden.

| Charakterisierung<br>des Proteins |               |         | markiert bei Behandlung<br>ganzer Zellen mit |                       |                                |              |                      | isol. PM<br>mit      |
|-----------------------------------|---------------|---------|----------------------------------------------|-----------------------|--------------------------------|--------------|----------------------|----------------------|
| MG in kd                          | Nr. in Tab. 4 | Antigen | $^{125}\text{I}$ -Lacto-<br>peroxidase       | $^{14}\text{C}$ -DNFB | $^3\text{H}$ -NAP <sub>4</sub> | Fluorescamin | $^{125}\text{I}$ INA | $^{125}\text{I}$ INA |
| 250                               |               |         |                                              | (+)                   |                                |              | ++                   | ++                   |
| 210 Myosin                        | 7             | (+)     |                                              |                       |                                | (+)          |                      | ++                   |
| 180                               |               | +       |                                              | +                     |                                |              | +                    | ++                   |
| 110                               | 15            | +       |                                              | ++                    | +                              | ?            |                      | +                    |
| 98                                | 4             |         | +                                            | (+)                   | ?                              | ?            | +                    | ++                   |
| 92                                | 11            |         | +                                            | (+)                   | ?                              | +            | +                    | ++                   |
| 77                                |               |         |                                              | +                     | +                              | ?            |                      |                      |
| 70                                | 12            |         | +                                            | +                     | ?                              | +            |                      |                      |
| 65                                |               |         |                                              | +                     | +                              |              |                      |                      |
| 57                                | 14            | +       | +                                            | ++                    | +                              | +            |                      |                      |
| 51                                | 1             |         | +                                            | +                     | +                              | +            |                      |                      |
| 48                                |               |         |                                              | +                     | +                              |              |                      |                      |
| 42 Aktin                          | 8             | (+)     |                                              |                       |                                | (+)          |                      | ++                   |
| 41                                | 19            |         | ++                                           | +                     | +                              | ++           | +                    | +                    |
| 39                                | 18            |         | +                                            | +                     | +                              | +            |                      |                      |
| 34                                |               | (?)     |                                              | +                     |                                | ?            |                      |                      |
| 29                                |               | (?)     |                                              | +                     | +                              | ?            |                      |                      |
| 26 Pallidin                       | 9             | +       | +                                            | +                     | +                              | +            | +                    | ++                   |
| 24                                | 3             |         |                                              | ?                     |                                | ?            |                      | ++                   |

Tab. 1 Markierungsversuche zur Topografie der PM von *P. pallidum*. Zeichenerklärung: ? = sehr schwache oder nicht sicher zuzuordnende Markierung, (+) = schwache Markierung, + deutliche Bande, ++ = Hauptbanden im betreffenden Markierungsmuster

- 3) Mit  $^{125}\text{I}$ NA werden bei Behandlung ganzer Zellen 6 Proteine markiert. Nach Bercovici und Gitler (1978) sind solche Proteine mit einem hydrophoben Teil in der Lipidschicht der PM verankert. Sie haben Molekulargewichte von 26, 41, 92, 98, 180 und ca. 250 kd.
- 4) Aktin und Myosin befinden sich mit grosser Wahrscheinlichkeit auf der Innenseite der PM.

### 3.3 Enzyme

#### 3.3.1 ATPase und ADPase

Werden intakte Zellen von *P. pallidum* mit  $^{14}\text{C}$ -ATP inkubiert (s. 2.5.7), so lässt sich ein Abbau von ATP über ADP zu AMP verfolgen (Fig. 9). Die aktiven Stellen einer ATPase und einer ADPase sind also vom extrazellulären Raum her für ihr jeweiliges Substrat zugänglich.

Ganze Zellen bauen nicht alles ATP zu ADP ab. Schon nach 2 min verflacht sich die Kurve. Es wird angenommen, dass die Zellen ADP wieder phosphorylieren können, so dass die ATP-Konzentration nie unter ein bestimmtes Niveau sinkt. Dies wurde durch nähere Untersuchungen bei *D. discoideum* bestätigt (Parish und Weibel, unveröffentlicht).

#### 3.3.2 Proteinkinasen

Durch Inkubation ganzer Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -ATP lassen sich mehrere Proteine der PM von *P. pallidum* phosphorylieren. Die schweren Ketten des Myosins werden stark markiert, alle andern Banden sind recht schwach und lassen sich z.T. erst nach langer Exponierung (3-4 Mt.) des Röntgenfilms erkennen (Fig. 10a).

Myosin wird schnell phosphoryliert; schon nach 30 sec, der kürzesten bei diesen Versuchen verwendeten Inkubationszeit, ist



Fig. 9 Abbau von ATP durch ganze Zellen. Durchschnittswerte aus 2 Ansätzen. Abszisse: Inkubationszeit in min. Ordinate: Verteilung der Radioaktivität auf ATP, ADP und AMP in % , 100%= gesamte Radioaktivität einer Probe auf der Dünnschichtplatte.

die maximale Intensität erreicht (Fig. 10a). Myosin wird nicht durch anorganisches Phosphat ( $^{32}\text{P}_i$ ) markiert, das aus der Spaltung von ATP an der Zelloberfläche stammt. Der Kontrollversuch, bei dem intakte Zellen mit  $^{32}\text{P}_i$  inkubiert werden, ergibt keine Markierungen in der PM. Ausserdem erfolgt die Phosphorylierung mit  $^{32}\text{P}$ -ATP in Phosphatpuffer (s. 2.4.4), so dass abgespaltenes  $^{32}\text{P}_i$  stark verdünnt wird.

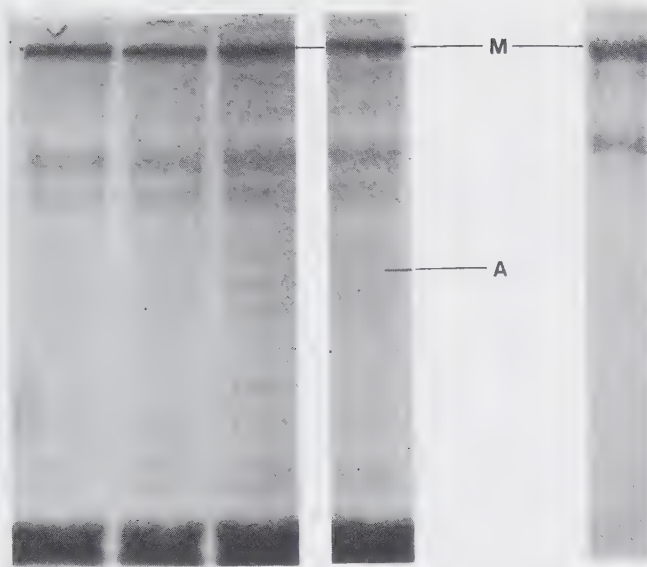


Fig. 10a

b

Fig. 10 Phosphorylierte PM-Proteine von *P. pallidum* nach Behandlung ganzer Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -ATP (10a) und  $^{32}\text{P}$ -GTP (10b), Autoradiogramme. M= Myosin, A= Stelle von Aktin. Die vier PM-Fraktionen in Fig. 10a wurden nach der abgekürzten Methode isoliert (s. 2.4.4). Die Inkubationszeiten mit  $^{32}\text{P}$ -ATP betrugen (von links nach rechts): 30 sec, 75 sec, 2 min, 5 min. Die Probe in Fig. 10b ist eine Standardpräparation mit Con A und Triton. Die Inkubationszeit mit  $^{32}\text{P}$ -GTP betrug 5 min.

Wie erwähnt, finden sich nach Markierung ganzer Zellen mit  $^{32}\text{P}$ -ATP neben der Hauptbande des Myosins mehrere schwächere Banden. Diese sind nach kurzer Exponierung der Filme zu schwach, nach längerem Exponieren zu diffus, als dass sie bestimmten Proteinen im Gel sicher zugeordnet werden könnten. Die stärkste Bande neben Myosin befindet sich in der Region von ca. 90 kd (Fig. 10). Eine weitere, schwächere Bande entspricht wahrscheinlich dem Protein mit 41 kd (19 in Tab. 4).

Bei Behandlung isolierter PM mit  $^{32}\text{P}$ -ATP wird ebenfalls Myosin am stärksten markiert. Von den schwächeren Banden können einige schon beschriebenen Proteinen zugeordnet werden. Es handelt sich um die Proteine mit folgenden Molekulargewichten: 39, 41, 70, 110 und 180 kd (s. Tab. 1).

Ein ähnliches Markierungsmuster entsteht mit  $^{32}\text{P}$ -GTP (Fig. 10b). Entweder ist die Proteinkinase nicht spezifisch für ATP, oder der Effekt deutet auf eine Nukleotid-Diphosphokinase in der PM, die ADP mit Hilfe von GTP phosphoryliert. Ein solches Enzym kommt in der PM von *D. discoideum* vor (Parish und Weibel, im Druck).

### 3.3.3 Adenylylcyclase

Das Enzym spielt eine wichtige Rolle in der Zelldifferenzierung von *D. discoideum* (Loomis, 1975; Gerisch und Malchow, 1976) und ist bei dieser Art gut untersucht (Rossomando und Sussman, 1972; Farnham, 1975; Rossomando und Cutler, 1975; Klein, 1976; Roos et al., 1977). Ein Vergleich der Adenylylcyclasen von *P. pallidum* und *D. discoideum* schien interessant, weil cAMP bei *Polysphondylium* nicht als Acrasin dient (Bonner et al., 1972).

Die folgenden Resultate gelten für *P. pallidum* und für *D. discoideum*, sofern sie nicht ausdrücklich einer der beiden Arten zugeordnet sind.

### 3.3.3.1 Stabilität von Enzym und Inkubationslösung

Die Adenylylcyclase ist *in vitro* sehr temperatursensitiv. Wird ein Zellhomogenat 30 min bei 23°C inkubiert, so ergibt sich ein Aktivitätsverlust von 50-70% gegenüber einer im Eisbad inkubierten Kontrolle. Bewahrt man ein Homogenat 24 h bei 4°C oder eingefroren bei -17°C auf, verliert das Enzym 70-90% seiner Aktivität. Diese Resultate sind vergleichbar mit Angaben von Klein (1976) und widersprechen Untersuchungen von Rossomando und Sussman (1972), die eine Inkubation von 30 min bei 37°C durchführen.

Die Adenylylcyclase wird durch Detergentien wie Triton X-100 gehemmt. Möglicherweise ist das Enzym nur aktiv, wenn es mit bestimmten Lipiden assoziiert ist, die durch Triton in Lösung gebracht werden können. Als aktivierende Lipide kämen v.a. Bestandteile von Membranen, in die das Enzymprotein integriert ist, in Frage (s. 3.3.3.4).

Die Inkubationslösung ist ebenfalls instabil und muss unmittelbar vor einem Versuchsansatz hergestellt werden. Wird die fertige Lösung bei 20°C aufbewahrt, misst man nach 2 h noch 90%, nach 4 h 60% der ursprünglichen Aktivität.

### 3.3.3.2 Wirkung verschiedener Hemmstoffe

Sussman und Schindler (1978) postulieren eine Hemmung der Adenylylcyclase von *D. discoideum* durch  $\text{NH}_3$ . Dies kann in eigenen Versuchen nicht bestätigt werden. Konzentrationen von 1-20 mM  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (gepuffert auf pH 7,8) haben keinen Einfluss auf die Enzymaktivität bei *D. discoideum*.

Natriumfluorid, das die Adenylylcyclase höherer Organismen stimuliert (Greengard und Costa, 1970), hemmt das Enzym von *D. discoideum* bei einer Konzentration von 5 mM um ca. 15%.

Nach Klein (1976) wird die Adenylylcyclase von *D. discoideum* durch 1 mM  $\text{Ca}^{++}$  völlig gehemmt. Eigene Versuche mit dem Enzym dieser Art ergeben folgende Resultate:

|                        |                |
|------------------------|----------------|
| Kontrolle              | 100% Aktivität |
| 0,5 mM EGTA            | 100% Aktivität |
| 0,5 mM $\text{CaCl}_2$ | 87% Aktivität  |
| 2 mM $\text{CaCl}_2$   | 58% Aktivität  |

Nach Rossomando und Hesla (1976) befreit Trypsin die 5'-Nukleotidase aus Plasmamembranvesikeln, greift aber die von ihnen nachgewiesene Adenylylcyclase nicht an. Sie inkubieren die Membranfraktion mit 1,5 mg/ml Trypsin 30 min bei 30°C. In eigenen Versuchen ist die Adenylylcyclase trypsinsensitiv. Eine Inkubation des Zellhomogenats mit 0,01-1 mg/ml Trypsin während 30 min bei Zimmertemperatur führt bei *D. discoideum* zu einem Aktivitätsverlust von 40-70% gegenüber einer Kontrollinkubation ohne Trypsin. Bei *P. pallidum* ergibt sich sogar ein Verlust von 90-95%.

Verschiedene Autoren beschreiben den Einfluss von Adenosin und Adenosinanalogen auf die Aktivität der Adenylylcyclase höherer Organismen (Sahyoun et al., 1976; Londos und Wolff, 1977; Prémont et al., 1977a,b). Parish (unveröffentlicht) beobachtete komplexe gegenseitige Beeinflussungen im Metabolismus von Adenosin, AMP, ADP, ATP und cAMP an der Zelloberfläche von *D. discoideum*. Es schien daher interessant, den Einfluss von Adenosin und verwandten Substanzen auf die Aktivität der Adenylylcyclase von *D. discoideum* und *P. pallidum* zu überprüfen.

In einem Zellextrakt sind endogene Konzentrationen von Adenosin zu erwarten, die die Adenylylcyclase-Aktivität beeinflussen könnten (Prémont et al., 1977a). Das Zellhomogenat wird daher mit Adenosindeaminase (0,6 U/ml; Sigma) 4 min bei Zimmertemperatur vorinkubiert. Dieser Abbau des endogenen Adenosins führt zu einem Aktivitätsverlust der Adenylylcyclase von 13-17%. Prémont et al. (1977b) hemmten eine Adenylylcyclase aus Rattenhirn durch die selbe Behandlung um 47%.

Die Wirkungen verschiedener Adenosinanalogen auf die Adenylylcyclase von *D. discoideum* und *P. pallidum* sind in Tabelle 2 zusammengestellt und mit Literaturwerten verglichen (s. auch 4.5):

| Zusatz                                   | Spezifische Aktivität in % der Kontrolle |                    |                   |
|------------------------------------------|------------------------------------------|--------------------|-------------------|
|                                          | <i>D. discoideum</i>                     | <i>P. pallidum</i> | Literatur         |
| 1 mM $\bar{N}^6$ -Methyladenosin         | 87                                       | 92                 | 173 <sup>1)</sup> |
| 0,1 mM 2-Chloro-Adenosin                 | 102                                      | n.b.*              | 140 <sup>1)</sup> |
| 1 mM 2-Chloro-Adenosin                   | 72                                       | 180                |                   |
| 0,1 mM 2'-deoxy-Adenosin                 | 109                                      | n.b.               | 70 <sup>1)</sup>  |
| 1 mM 2'-deoxy-Adenosin                   | 90                                       | n.b.               |                   |
| 0,1 mM 3'-deoxy-Adenosin<br>(Cordycepin) | 109                                      | n.b.               | 21 <sup>1)</sup>  |
| 0,1 mM 2'-deoxy-3'-AMP                   | 75                                       | 102                | 20 <sup>2)</sup>  |

1) Londos und Wolff, 1977

2) Sahyoun et al., 1976

\* nicht bestimmt

### 3.3.3.3 Veränderung der Aktivität während der Differenzierung

In Uebereinstimmung mit Literaturangaben (Klein, 1976; Roos et al., 1977) kann während der Aggregationsphase von *D. discoideum* ein starker Anstieg (ca. 10 x; nach Klein, 1976: 40 x) der spezifischen Aktivität der Adenylcyclase festgestellt werden. Gegen Ende der Aggregation fällt die Aktivität auf ein Niveau, das etwa der fünffachen Aktivität von vegetativen Zellen entspricht (Fig. 11). Das Maximum liegt in der Zeit der stärksten Aggregationsbewegungen der Myxamöben.

Während der Differenzierung von *P. pallidum* verdoppelt sich die spezifische Aktivität des Enzyms. Die Kurve (Fig. 11) steigt fast regelmässig an. Verschiedene Versuche ergeben für Zellen in der Aggregationsphase eine grosse Streuung der Resultate. Ob dies eine physiologische Bedeutung hat, ist nicht zu entscheiden.

Der Vergleich der beiden Kurven in Fig. 11 zeigt deutlich, dass dem cAMP während der Aggregation von *D. discoideum* eine grosse Bedeutung (als Acrasin) zukommt. Bei *P. pallidum*, dessen Acrasin noch nicht genau bekannt ist (Wurster et al., 1976), hat cAMP sicher andere Funktionen im Zelldifferenzierungsprozess

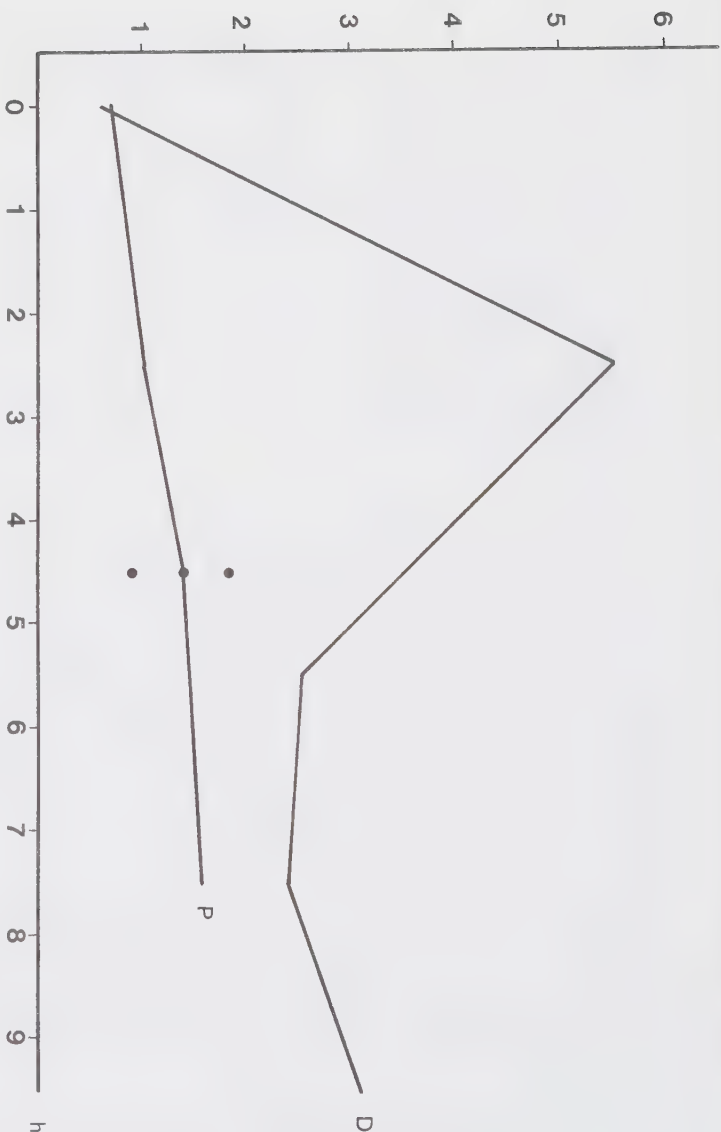


Fig. 11 Veränderungen der spezifischen Aktivitäten der Adenylylcyclasen von *D. discoideum* (D) und *P. pallidum* (P) während der Differenzierung. Die 3 Punkte beim 4 1/2 h-Stadium von *P. pallidum* sind Resultate dreier verschiedener Versuche; in allen übrigen Stadien ist die Streuung kleiner. Abszisse: Zeit nach Futterentzug. Ordinate: spezifische Aktivität der Adenylylcyclase in pMol cAMP/mg Protein  $\times$  min<sup>-1</sup>

(Francis, 1975; Hohl et al., 1977). Es ist daher nicht überraschend, dass sich die Aktivität der Adenylylcyclase während der Entwicklung der beiden Arten unterschiedlich verändert.

#### 3.3.3.4 Lokalisierung der Adenylylcyclase

Farnham (1975) und Rossomando und Cutler (1975) postulieren bei *D. discoideum* eine plasmamembrangebundene Adenylylcyclase. Daher werden intakte Myxamöben auf Adenylylcyclase-Aktivität untersucht. Da keine Aktivität messbar ist, lässt sich daraus schliessen, dass das Enzym vom extrazellulären Raum her für das Substrat nicht zugänglich ist. Dies stimmt überein mit der Untersuchung von Klein (1976).

Phagocytische Vakuolen, deren Membranen von der PM stammen, werden von *D. discoideum* nach der Methode von Parish und Pelli (1974) isoliert. Diese Fraktion enthält keine nachweisbare Adenylylcyclase-Aktivität.

PM von *P. pallidum*, isoliert nach der Methode von Parish und Müller (1976) mit Con A und Triton, weisen nur eine sehr geringe Adenylylcyclase-Aktivität auf ( $0,1-0,2 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ). Gegenüber einem mit Ultraschall hergestellten Lysat ganzer Myxamöben bedeutet dies eine 5-6 x kleinere spezifische Aktivität. Nach der Isolierung der PM lässt sich aber auch in der restlichen Fraktion des Homogenats kaum mehr Adenylylcyclase-Aktivität nachweisen ( $0-0,15 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ). Dies bedeutet, dass Triton X-100 in der verwendeten Konzentration von 0,5% das Enzym hemmt.

Kerne von *D. discoideum* und *P. pallidum* werden nach der Methode von Charlesworth und Parish (1977) isoliert und anschließend mit Ultraschall aufgeschlossen. Die Aktivität der Adenylylcyclase liegt in diesem Homogenat knapp über der Nachweisgrenze (um  $0,2 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ). Die Aktivität könnte aber bedeutend höher sein, wenn angenommen wird, dass das Enzym in der Kernmembran integriert ist. Diese ist während der Lyse der Zellen zur Kernisolierung einer Tritonkonzentration von 0,1% ausgesetzt, was zu einer teilweisen Inaktivierung der Adenylylcyclase führen würde.

Legenden zu den Fig. 12 und 13

Fig. 12 Verteilung der spezifischen Aktivitäten verschiedener Leitenzyme und der Adenylylcyclase von *P. pallidum* auf die Fraktionen der differentiellen Zentrifugation. Ordinate: Anteil an der gesamten spezifischen Aktivität (alle drei Sedimente = 100%)  $\pm$  Standardabweichung.

- 1) NADPH-Oxidoreduktase (n = 2)
- 2) Malatdehydrogenase (n = 6)
- 3)  $\alpha$ -Mannosidase (n = 6)
- 4)  $\beta$ -N-Acetyl-Glukosaminidase (n = 6)
- 5) Alkalische Phosphatase (n = 6)
- 6) Adenylylcyclase (n = 5)

Fig. 13 Spezifische Aktivitäten von Alkalischer und Saurer Phosphatase und Adenylylcyclase von *D. discoideum* in drei Teilen des Saccharosegradienten in Fig. 14. Abszisse: Nummer der zusammengefassten Fraktionen. Ordinate: Einheit für die Phosphatasen:  $\Delta E_{400nm}/mg$  Protein  $\times 30 \text{ min}^{-1}$ ; für die Adenylylcyclase:  $pMol \text{ cAMP}/mg \text{ Protein} \times \text{min}^{-1}$

- 1) Saure Phosphatase
- 2) Alkalische Phosphatase
- 3) Adenylylcyclase

Werden die Myxamöben mechanisch aufgeschlossen (s. 2.2.3), lässt sich eine Inaktivierung der Adenylylcyclase vermeiden. Das Homogenat wird mittels differentieller Zentrifugation (3000 g, 30'000 g, 150'000 g) in drei Schritten aufgetrennt (s. 2.2.3). In den drei Sedimenten (3 S, 30 S und 150 S) werden nebst der Adenylylcyclase folgende Markerenzyme (De Pierre und Karnovsky, 1973) gemessen:

- 1) Malatdehydrogenase als Leitenzym der Mitochondrien
- 2) NADPH-Oxidoreduktase als Leitenzym des Endoplasmatischen Retikulums (ER)

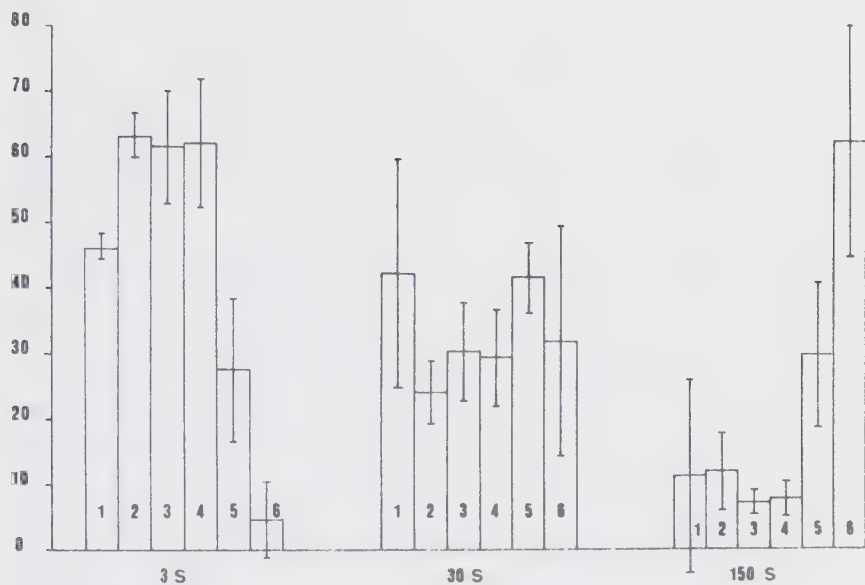


Fig. 12

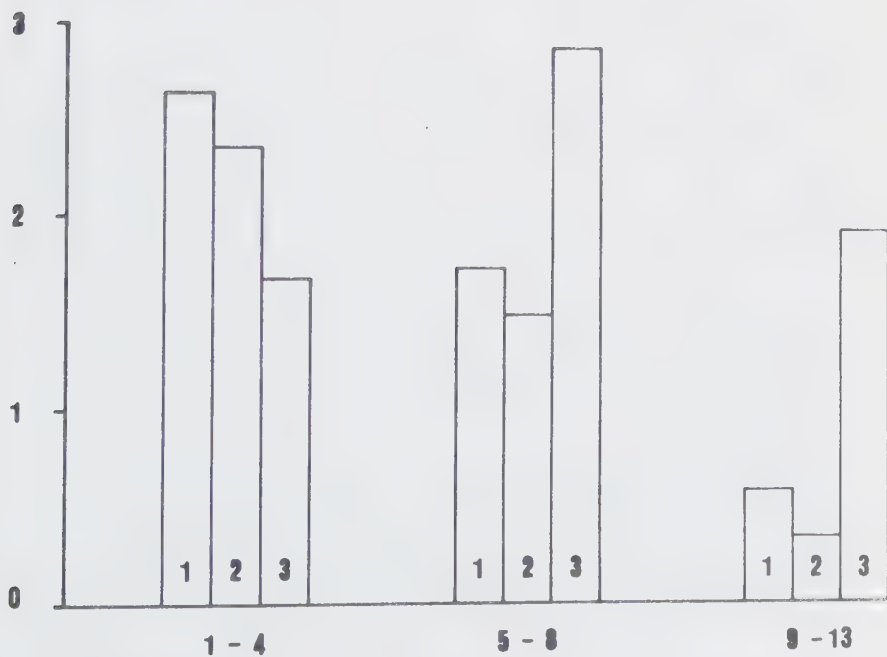


Fig. 13

- 3)  $\alpha$ -Mannosidase und  $\beta$ -N-Acetyl-Glukosaminidase als Leitenzyme des lysosomalen Systems
- 4) Alkalische Phosphatase (= 5'-Nukleotidase; Gezelius und Wright, 1965) als Leitenzym der PM (Green und Newell, 1974)

Frühere Arbeiten mit *D. discoideum* (Hintermann, 1974) haben gezeigt, dass sich in der 150 S-Fraktion relativ hohe spezifische Aktivitäten der Alkalischen Phosphatase (ca. 40% der Summe aller drei Sedimente) finden. Der Hauptanteil (um 90%) der Aktivitäten aller andern Leitenzyme sedimentiert in den ersten beiden Zentrifugationen, so dass sich in der 150 S-Fraktion eine Anreicherung von PM ergibt (s. auch 3.1). Die Ergebnisse können mit Zellen von *P. pallidum* reproduziert werden: In Fig. 12 ist die Verteilung der spezifischen Aktivitäten der oben aufgeführten Leitenzyme auf die drei Fraktionen dargestellt und mit den Adenylylcyclase-Aktivitäten verglichen. Aus den Resultaten geht hervor, dass sich in der 3 S-Fraktion der Hauptanteil der Mitochondrien und der Membranen des lysosomalen Systems finden, zusätzlich auch ER und PM. Die Aktivität der Adenylylcyclase ist sehr klein, in einigen Versuchen nicht nachweisbar.

Die 30 S-Fraktion besteht aus einem fast homogenen Gemisch aller Enzyme und damit aller entsprechenden Organelle.

Bei 150'000 g sedimentieren nur noch wenige Fragmente von Mitochondrien, ER und lysosomalen Membranen. Es finden sich jedoch 30% der spezifischen Aktivität der Alkalischen Phosphatase und 63% der Adenylylcyclase-Aktivität in dieser Fraktion.

Das Verteilungsmuster der Adenylylcyclase ist also am ehesten mit jenem der Alkalischen Phosphatase vergleichbar, weicht aber doch so stark davon ab, dass auf Grund dieser Resultate nicht von einer plasmamembrangebundenen Adenylylcyclase gesprochen werden kann.

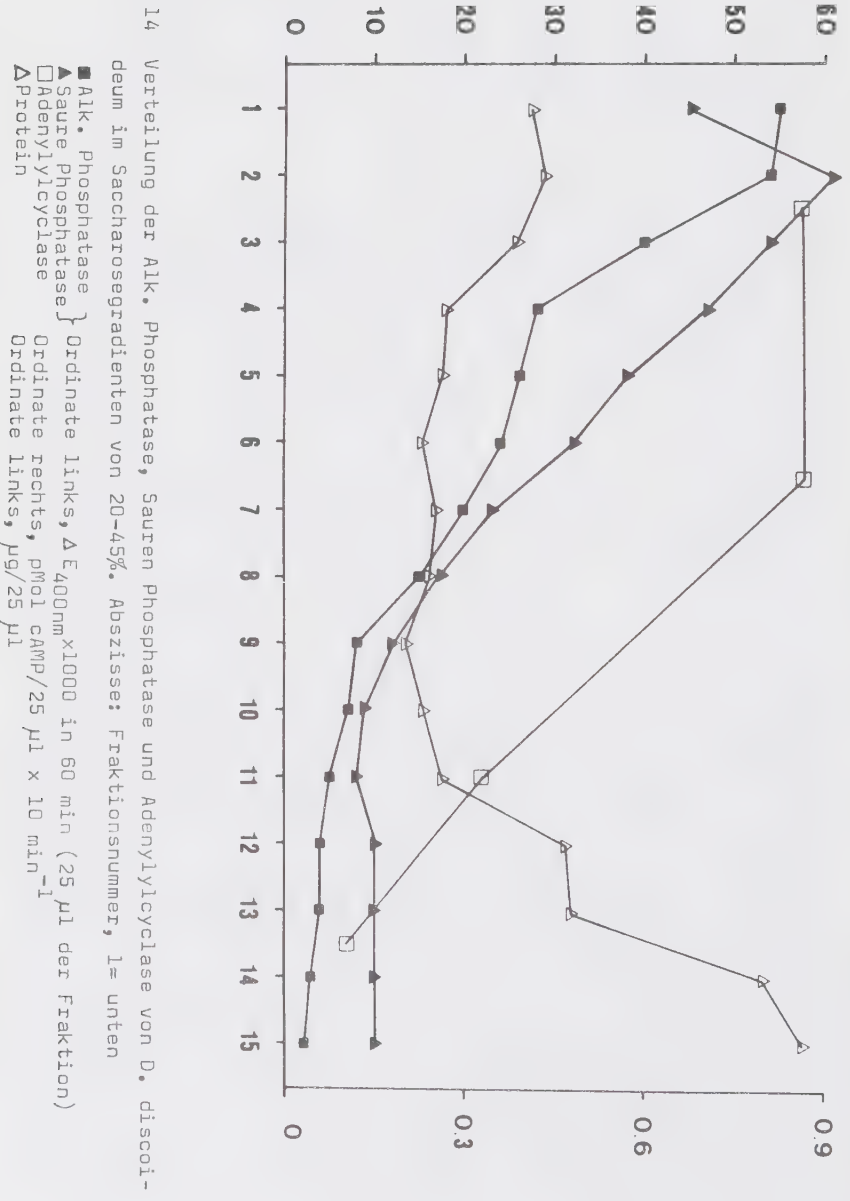
Im Ueberstand der 150'000 g Zentrifugation ist die Adenylylcyclase-Aktivität sehr klein: ca. 0,1 pMol cAMP/mg Protein  $\times$  min<sup>-1</sup>. Als Vergleich kann die Aktivität des Sediments (150 S-Fraktion) dienen. Sie schwankt zwischen 2,3 und 5,6 pMol cAMP/mg Protein  $\times$  min<sup>-1</sup>. Das Enzym ist also entweder sehr

stabil in sedimentierbaren Strukturen integriert, oder es wird bei der Solubilisierung inaktiviert. Die niedrige Aktivität im Ueberstand ist nicht durch einen löslichen Hemmstoff bedingt. Dies geht aus Versuchen hervor, bei denen eine Mischung von Ueberstand und 150 S-Fraktion als Enzymquelle verwendet wird. Der Zusatz von Ueberstand setzt die Aktivität des Sediments nicht herab.

Zur weiteren Auftrennung eines Homogenats von *D. discoideum* werden Saccharose-Dichtegradienten eingesetzt (s. 2.2.3). Die Fraktion, die zwischen 10'000g und 150'000 g sedimentiert, nach den oben beschriebenen Resultaten also den grössten Teil der Adenylylcyclase-Aktivität enthält (Tab. 3), wird im Gradienten aufgetrennt. Die anschliessende Bestimmung der Aktivitäten von Alkalischer und Saurer Phosphatase in den einzelnen Fraktionen zeigt, wie sich PM und lysosomale Membranen im Gradienten verteilen. Die Peaks der beiden Kurven lassen sich nicht trennen, die Kurve der Alkalischen Phosphatase tendiert jedoch immer zur Ausbildung einer Schulter in Richtung abnehmender Dichte, jene der Sauren Phosphatase fällt steiler ab. Fig. 14 zeigt die Verteilung der beiden Phosphatasen im Gradienten von 20-45% Saccharose. Aufgetragen wird das 150'000 g Sediment des in Tab. 3 beschriebenen Versuches. Die Fraktionen 1-4, 5-8 und 9-13 werden je vereinigt, mit Gradientenpuffer verdünnt und 30 min bei 150'000 g zentrifugiert. Alle drei Sedimente enthalten Adenylylcyclase-Aktivität (Fig. 14). Diese verteilt sich aber nicht parallel zu den Phosphatase-Aktivitäten. Im Gradienten bestätigen sich somit die

Tab. 3 Verteilung der spezifischen Aktivität der Adenylylcyclase von *D. discoideum* während der differentiellen Zentrifugation vor dem Dichtegradienten

|                      |                                               |
|----------------------|-----------------------------------------------|
| Homogenat            | 0,16 pMol cAMP/mg Protein x min <sup>-1</sup> |
| 10'000 g Sediment    | -                                             |
| 150'000 g Sediment   | 1,24 pMol cAMP/mg Protein x min <sup>-1</sup> |
| 150'000 g Ueberstand | -                                             |



Resultate der differentiellen Zentrifugation, die zeigen, dass die Strukturen mit Adenylylcyclase-Aktivität eine geringere Dichte aufweisen als die bekannten Organelle, eingeschlossen die Plasmamembran.

Noch deutlicher kommt dies zum Ausdruck, wenn man die spezifischen Aktivitäten der Enzyme in den drei Teilen des Gradienten vergleicht (Fig. 13). Die Anreicherung von Membranen mit Phosphatase-Aktivitäten ist im dichtesten Teil (Fraktionen 1-4) am stärksten, hier ist aber die spezifische Aktivität der Adenylylcyclase am kleinsten ( $1,69 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ). Ihr Maximum ( $2,86$ ) befindet sich im mittleren Teil des Gradienten (Fraktionen 5-8) bei einer durchschnittlichen Dichte von  $1,125$  ( $20^{\circ}\text{C}$ ). Sie ist aber auch in den leichtesten Fraktionen (9-13) noch relativ hoch, nämlich  $1,93 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ .

Wird ein Homogenat von *P. pallidum* über einen Dichtegradienten wie oben beschrieben aufgetrennt, verteilen sich die Enzymaktivitäten ähnlich wie bei *D. discoideum*. In Fig. 15 finden sich die Resultate einer solchen Auftrennung eines Homogenats von *P. pallidum* in einem 30-55%-igen Saccharosegradienten. Die vereinigten Fraktionen 3-6, die die höchsten Aktivitäten an Alkalischer und Saurer Phosphatase enthalten, weisen eine geringere Aktivität der Adenylylcyclase auf ( $0,84 \text{ pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ) als die darüberliegenden Fraktionen 7-12 ( $1,07 \text{ pMol/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$ ).

Die Messung von ATPase und cAMP-Phosphodiesterase in den Gradientenfraktionen gibt ebenfalls Aufschluss über die Verteilung der PM im Gradienten. Fig. 16 zeigt, dass sich beide Enzyme parallel zu den Phosphatasen verteilen. Auch hier ergibt sich also keine Übereinstimmung mit dem Verteilungsmuster der Adenylylcyclase.

Die Gradientenfraktionen werden auch elektronenmikroskopisch untersucht. Ein Zellhomogenat von *P. pallidum* wird in der oben beschriebenen Weise in einem 20-45%-igen Saccharosegradienten aufgetrennt. Die vereinigten Fraktionen von 34-45% w/v Saccharose (Dichte  $1,128$ - $1,169$  bei  $20^{\circ}\text{C}$ ) enthalten die Hauptaktivitäten von Alkalischer und Saurer Phosphatase. Das elektronen-

Legende zu Fig. 15

Fig. 15 Verteilung von Alkalischer Phosphatase, Saurer Phosphatase und Adenylylcyclase von *P. pallidum* im Saccharosegradienten von 30-55%. Säulen: Spezifische Aktivitäten der Adenylylcyclase in den vereinigten Fraktionen 3-6 und 7-12.

Abszisse: Fraktionsnummer, 1 = unten, 15 = oben

Ordinate links: ● Alkalische Phosphatase,  $E_{400nm}/30 \text{ min} \times 100$  (50  $\mu\text{l}$  der Fraktion)

□ Saure Phosphatase,  $E_{400nm}/60 \text{ min} \times 100$  (50  $\mu\text{l}$  der Fraktion)

Ordinate rechts: ★ Adenylylcyclase,  $\text{pMol cAMP/mg Protein} \times \text{min}^{-1}$

mikroskopische Bild zeigt eine heterogene Membranfraktion (Fig. 17). Neben runden Vesikeln mit einem Durchmesser um 0,5  $\mu\text{m}$  kommen schleifenartige Membranstücke und einige Mitochondrien vor. Aus dem Enzymgehalt dieser Fraktionen (s. oben) lässt sich schliessen, dass die membranartigen Strukturen vorwiegend PM-Fragmente darstellen, die sich während des Homogenisierens grösstenteils zu Vesikeln formiert haben (De Pierre und Karnovsky, 1973).

Die Fraktionen aus dem Bereich von 23-34% w/v Saccharose (Dichte 1,086-1,128 bei 20°C), in denen sich die höchste spezifische Aktivität der Adenylylcyclase findet, erscheinen im Elektronenmikroskop als einheitlichere Vesikelfraktion (Fig. 18). Die Verteilung der Markerenzyme für die PM (Alkalische Phosphatase, cAMP-Phosphodiesterase, ATP'ase; Fig. 16) im Gradienten macht es unwahrscheinlich, dass alle diese Vesikeln aus PM bestehen. Ein grosser Teil von ihnen dürfte aber Träger der Adenylylcyclase sein (s. Fig. 13-15). Diese ist somit kaum plasmamembrangebunden. Da auch in den dichteren Fraktionen Adenylylcyclase-Aktivität vorhanden ist, kommt dieser Vesikeltyp dort sicher auch vor, ist aber von den oben erwähnten PM-Fragmenten nicht zu unterscheiden.

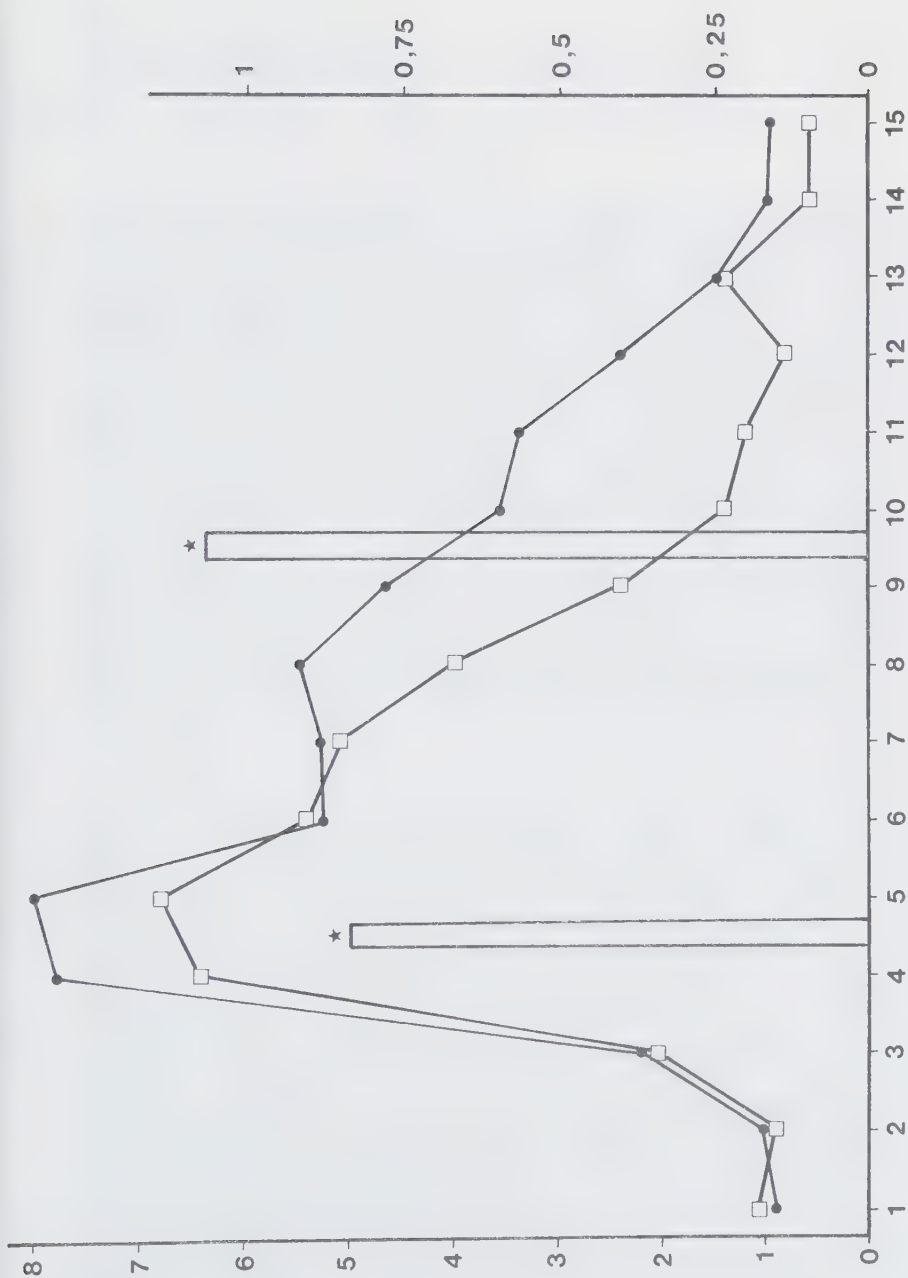


Fig. 15

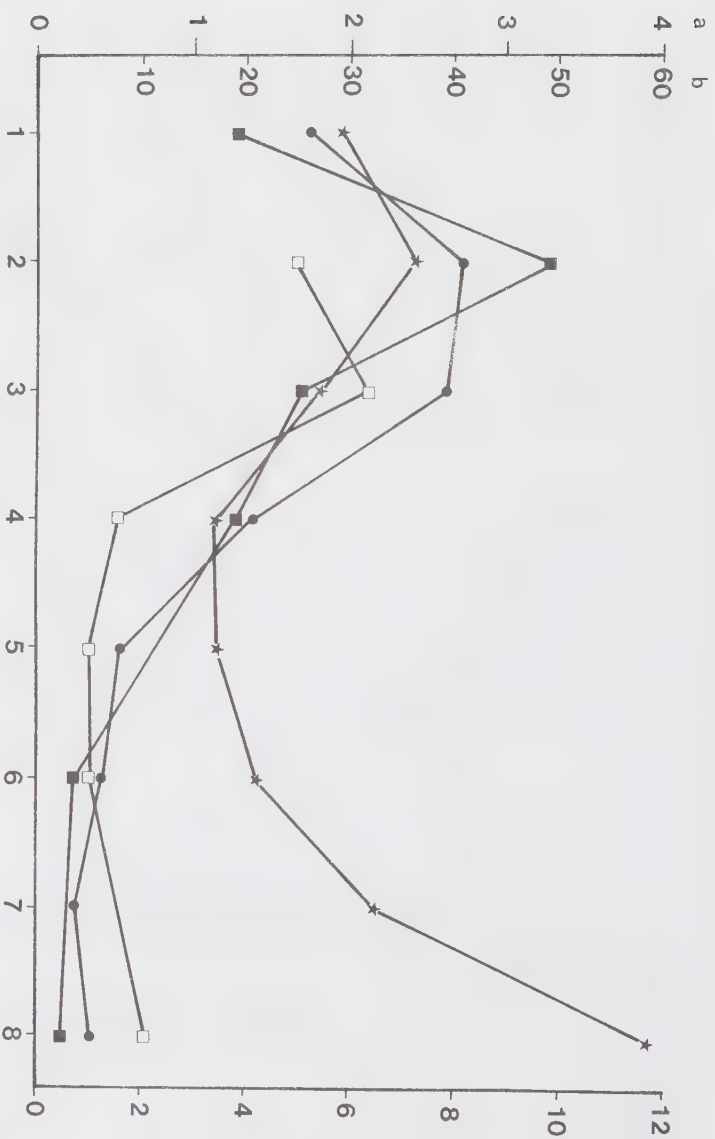


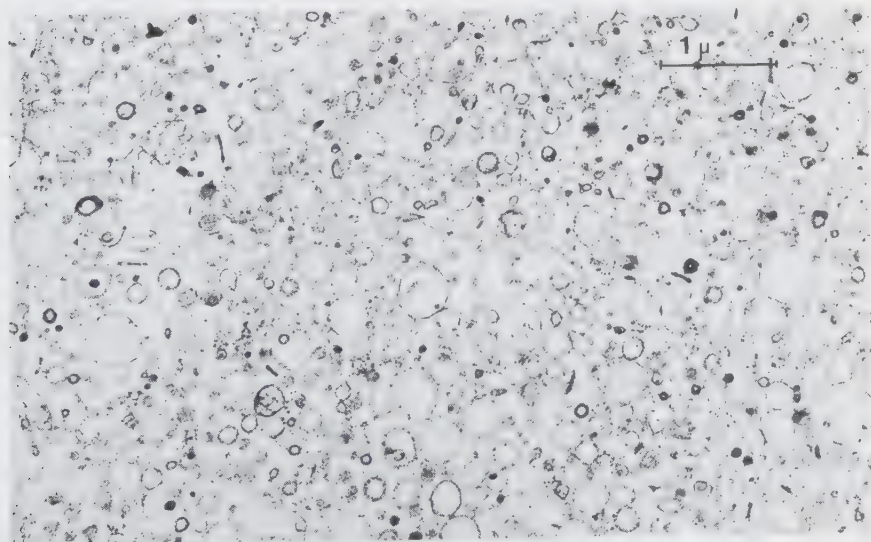
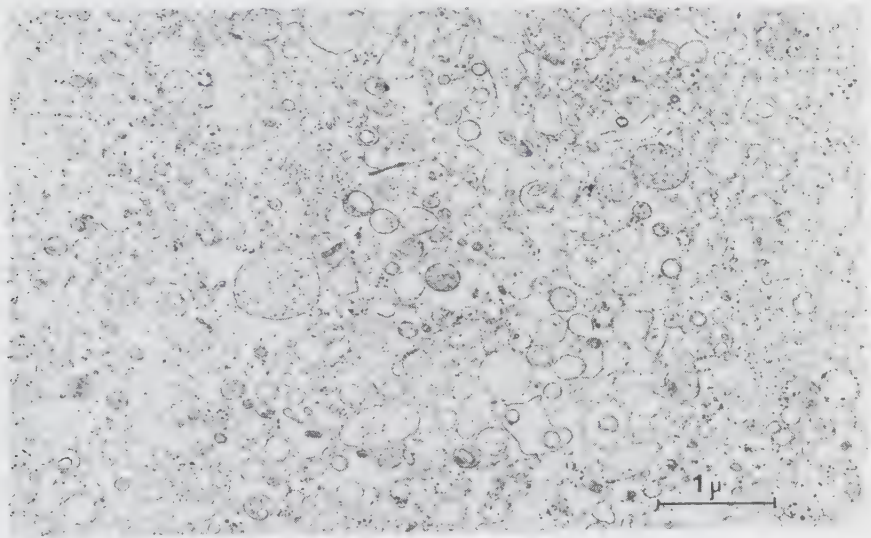
Fig. 16 Verteilung von ATPase, Alk., Phosphatase und cAMP-Phosphodiesterase von *P. pallidum* im Saccharosegradienten von 20-45%. Abszisse: Fraktionsnummer, 1= unten, 8= oben Ordinate links: a) ■ Alk., Phosphatase,  $\Delta E_{400nm}/30 \text{ min} \times 100$ ; b) ● ATPase, % ATP abgebaut Ordinate rechts: \* Protein,  $\mu\text{g}/50 \mu\text{l}$ ; □ cAMP-Phosphodiesterase, % cAMP abgebaut

EM-Aufnahmen der Membranen eines Homogenats von *P. pallidum*,  
aufgetrennt im Saccharosegradienten von 20-45% w/v

Fig. 17 (oben) Dichte Fraktionen (34-45% Saccharose)

Fig. 18 (unten) Leichte Fraktionen (23-34% Saccharose)

(EM-Aufnahmen: P. Gehrig)



Zur Erklärung der Herkunft dieser Strukturen mit Adenylyl-cyclase-Aktivität bieten sich zwei Möglichkeiten an (s. auch 4.5):

- 1) Die Vesikeln bestehen schon in vivo als einheitliche Population in den Myxamöben.
- 2) Sie werden während der Reinigung aus grösseren Membranstücken gebildet, z.B. aus bestimmten Teilen des Endoplasmatischen Retikulums.

### 3.4 Veränderungen im Protein- und Glykoproteinemuster der PM während der Differenzierung

#### 3.4.1 Markierungen mit $^{14}\text{C}$ -Acetat

Der Differenzierungsprozess von *P. pallidum* wird in 6 verschiedene Perioden unterteilt (s. Fig. 1):

- 0 vegetative Myxamöben
- I beginnende Aggregation: 0-2 (2½) h nach Futterentzug
- II mittlere Aggregation: 2-4 (4½) h
- III späte Aggregation: 4-6 h
- IV Spitzenbildung: 6-7½ (8) h
- V Kulmination: 7½-9 (9½) h

Die Zellen werden während den angegebenen Zeiten mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat markiert (s. 2.1.5). Anschliessend wird die PM isoliert und im Polyacrylamidgel aufgetrennt (s. 2.3). Fig. 19 zeigt die Proteinmuster von PM aus den Stadien 0-V. Die dazugehörigen Autoradiogramme sind in Fig. 20 dargestellt. Neben einigen Proteinen, in die während des ganzen Differenzierungsprozesses  $^{14}\text{C}$ -Acetat eingebaut wird, finden sich solche, deren Einbauraten sich drastisch ändern.

32 Proteine, die in den verschiedenen Versuchen regelmässig identifizierbar sind, sind ausgewählt worden, und ihre Synthesephasen sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die Molekulargewichte sind Schätzungen anhand der Laufgeschwindigkeiten im SDS-Gel (s. 2.3.4). Die Reihenfolge der Proteine in Tab. 4 ist

chronologisch, entspricht also der Reihenfolge ihres Auftretens im Lebenszyklus von *P. pallidum*. Nach diesem Kriterium lassen sich zwei Hauptgruppen unterscheiden:

- 1) Proteine, in die schon während der vegetativen Phase  $^{14}\text{C}$ -Acetat eingebaut wird: Nr. 1-16
  - a) Die Synthese hört im Laufe der Differenzierung auf: Nr. 1-6
  - b) Die Synthese findet ständig statt. Die Einbaurrate sinkt während des Lebenszyklus leicht: Nr. 7-9
  - c) Die Synthese ist ebenfalls andauernd, die maximale Einbaurrate wird aber erst im Laufe der Differenzierung erreicht: Nr. 10-16
- 2) Proteine, deren Synthese erst nach dem vegetativen Stadium einsetzt: Nr. 17-32

Die Proteine Nr. 17-19 und 31 sind nur bei Markierungen mit Zuckern (s. 3.4.2) deutlich zu identifizieren, da sie bei Acetatmarkierungen durch die breiten Banden von Myosin respektive Aktin verdeckt sind.

Protein 1 ist auf einem mit Amidoschwarz gefärbten Gel als deutliche Bande zu erkennen (Fig. 19). Obwohl die Synthese fast ausschliesslich in vegetativen Zellen stattfindet, bleibt die Bande im Gel auch während späterer Stadien erhalten.

Protein 5 ist schwierig von Protein 12 zu unterscheiden; die Abtrennung gelingt nur durch Vergleiche mit Zuckermarkierungen und mit Gelen, auf denen Antigene nachgewiesen werden (s. 3.4.3). Die unter 3.4.3 beschriebenen Resultate machen aber deutlich, dass eine gesonderte Aufführung dieser Bande gerechtfertigt ist.

In der Gruppe 1b finden sich die schweren Ketten des Myosins (Doppelbande 7) und Aktin (8), die also beide ständig synthetisiert werden. Bei Bande 9 kann Pallidin (s. 3.1) beteiligt sein, zusätzlich ist aber ein Glykoprotein (10) an der gleichen Stelle vorhanden, was aus Zuckermarkierungen und Färbungen mit Con A/Peroxidase hervorgeht.

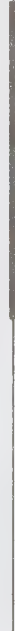
In der Gruppe 1c fällt Protein 11 nur gerade während der Phase I auf; seine Markierung ist hier neben derjenigen von Aktin und

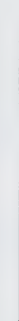
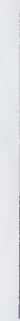
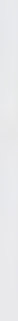
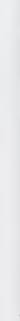
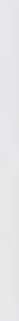
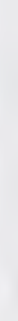
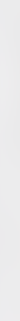
Tab. 4

Synthesephasen der PM-Proteine von *P. pallidum*. Die Einbauraten von  $^{14}\text{C}$ -Acetat während 6 Differenzierungsstadien sind grafisch dargestellt. Die Breite des Balkens gibt die Intensität der Markierung an. Der Einbau von  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin und  $^3\text{H}$ -Fukose ist mit + oder - angegeben, wobei + bedeutet: Der betreffende Zucker wird eingebaut, die Einbauphasen können aber von jenen der  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Markierung abweichen (Näheres s. Text).

## Differenzierungsstadien (s. Fig. 1)

Protein Nr. MG(kd) Fuk. Gluk. 0 vegetativ I frühe A. II Mitte A. III späte A IV Spitzen V Kulmination

|            |     |   |   |                                                                                    |  |
|------------|-----|---|---|------------------------------------------------------------------------------------|--|
| 1          | 51  | ? | ? |  |  |
| 2          | 34  | ? | ? |  |  |
| 3          | 24  | ? | + |  |  |
| 4          | 98  | + | + |  |  |
| 5          | 71  | + | + |  |  |
| 6          | 63  | + | + |  |  |
| Myosin 7   | 210 | - | - |  |  |
| Aktin 8    | 42  | - | - |  |  |
| Pallidin 9 | 26  | - | - |  |  |
| 10         | 26  | + | + |  |  |
| 11         | 92  | + | + |  |  |
| 12         | 70  | - | - |  |  |
| 13         | 80  | + | + |  |  |

|    |     |     |   |                                                                                    |                                                                                   |                                                                                   |                                                                                   |
|----|-----|-----|---|------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------|
| 14 | 57  | +   | + |   |   |   |   |
| 15 | 110 | (+) | + |  |  |  |  |
| 16 | 50  | +   | + |  |  |  |  |
| 17 | 195 | +   | + |   |  |  |  |
| 18 | 39  | +   | - |   |  |  |  |
| 19 | 41  | +   | + |   |  |  |  |
| 20 | 66  | +   | + |   |  |  |  |
| 21 | 120 | (+) | + |   |  |  |  |
| 22 | 300 | -   | + |   |  |  |  |
| 23 | 140 | -   | + |   |  |  |  |
| 24 | 29  | ?   | + |   |  |  |  |
| 25 | 53  | +   | + |   |  |  |  |
| 26 | 150 | +   | + |   |  |  |  |
| 27 | 115 | +   | + |   |  |  |  |
| 28 | 27  | +   | + |   |  |  |  |
| 29 | 74  | +   | + |   |  |  |  |
| 30 | 36  | -   | + |   |  |  |  |
| 31 | 225 | +   | + |   |  |  |  |
| 32 | 30  | ?   | + |   |  |  |  |

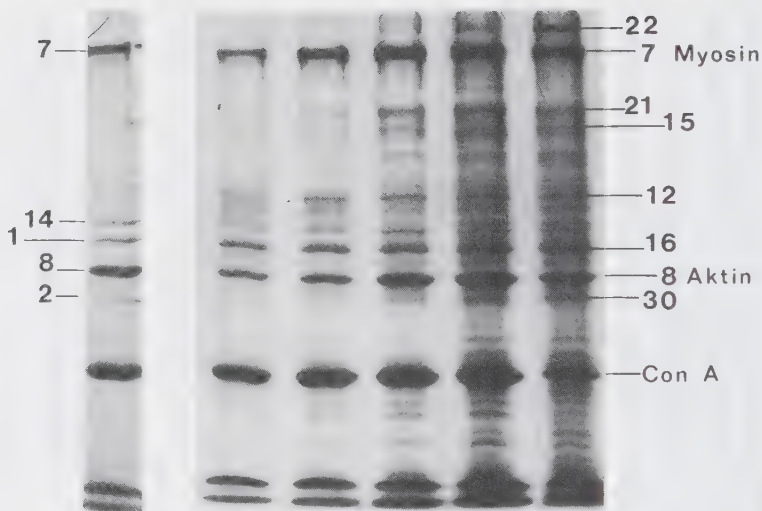


Fig. 19 Proteinmuster der PM von *P. pallidum* aus verschiedenen Differenzierungsstadien (0-V) Wichtige Banden sind mit der Nummer des Proteins in Tab. 4 bezeichnet

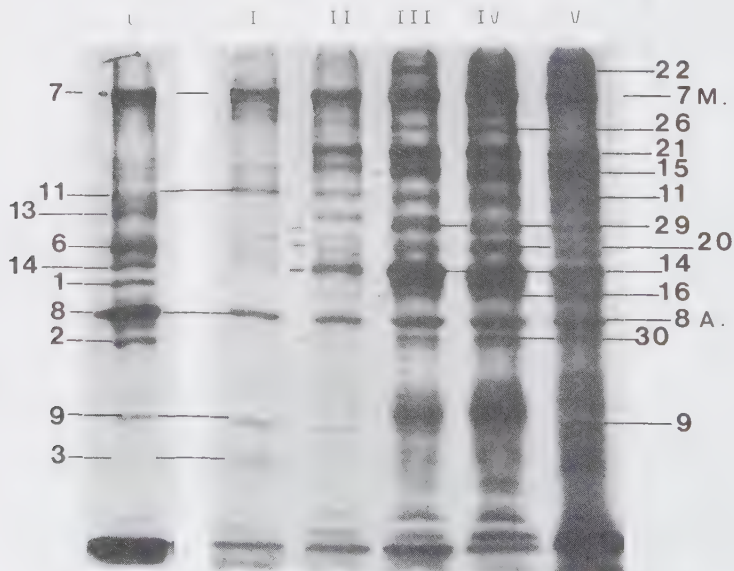


Fig. 20 Autoradiogramme der Gele in Fig. 19,  $^{14}\text{C}$ -Acetat-Markierung, Nummern wie in Fig. 19

Myosin eine der stärksten. Protein 14 zeigt ein interessantes Phänomen: Die Einbaurate ist in vegetativen Zellen hoch, sinkt während der frühen Aggregationsphase fast auf Null und steigt später wieder an bis zu einem Maximum in Phase III und IV. Allerdings muss in Betracht gezogen werden, dass das zweite Maximum auch durch ein anderes Protein mit sehr ähnlicher Grösse verursacht werden könnte (s. 3.4.3). Die Markierung ist eine der stärksten ab Mitte Aggregation. Eine weitere starke Bande wird durch Protein 15 am Ende der Aggregationsphase hervorgerufen.

Als auffälligste Markierung der Gruppe 2 erscheint zuerst Protein 21 mitten in der Aggregationsphase (II), in Phase III kommen 22 und 28 dazu. Protein 28 zeigt immer eine diffuse Bande im Autoradiogramm, dies wahrscheinlich deshalb, weil die Laufgeschwindigkeit mit jener von Con A identisch ist. Con A ist in der PM-Präparation in grossen Mengen vorhanden und verhindert so die Ausbildung einer scharfen Bande in diesem Bereich des Gels.

Die restlichen in Tab. 4 aufgeführten Markierungen sind zwar immer deutlich vorhanden, aber etwas weniger ausgeprägt und werden daher nicht einzeln besprochen.

### 3.4.2 Markierungen mit $^{14}\text{C}$ -Glukosamin und $^3\text{H}$ -Fukose

Mit beiden Zuckern werden Aktin und Myosin nie markiert, obwohl während des ganzen Differenzierungsprozesses  $^{14}\text{C}$ -Acetat in diese Proteine eingebaut wird. Dies zeigt, dass die verwendeten radioaktiven Zucker direkt in die Glykoproteine gelangen und während der kurzen Markierungszeiten (2-2½ h) kaum metabolisiert werden.

Die Fütterungsversuche mit Zuckern werden nur mit Zellen ausgeführt, die sich im Differenzierungsprozess befinden. Die Resultate beschreiben also die Einbauraten der Glykoproteine ab Phase I; Daten von vegetativen Zellen fehlen. Deshalb können die Proteine 1 und 2 hier nicht beurteilt werden.

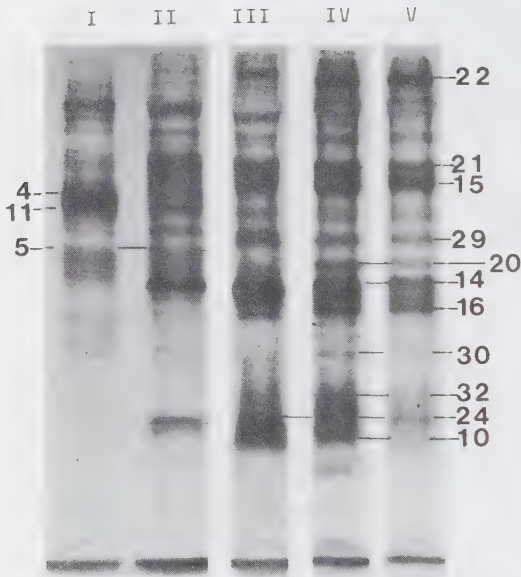


Fig. 21

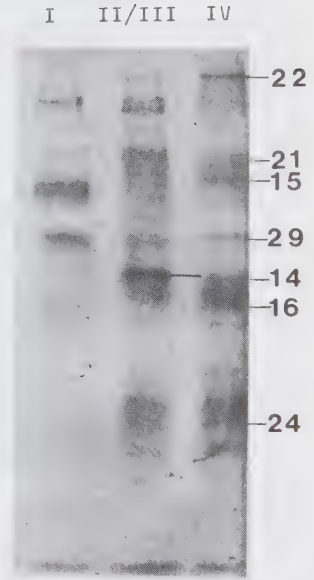


Fig. 22

Wichtige Banden sind mit der Nummer des Proteins in  
Tabelle 4 bezeichnet

Fig. 21  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin-Markierung von Zellen ver-  
schiedener Differenzierungsstadien (I-V)  
Autoradiogramme der PM-Proteinmuster

Fig. 22 Gleiches Experiment wie in Fig. 21, die  
PM wurde jedoch mit Digitonin statt mit  
Con A und Triton isoliert

Fast alle Proteine, in die  $^{14}\text{C}$ -Acetat eingebaut wird, werden auch mit Zuckern markiert (Fig. 21). Die meisten der während der Differenzierungsphase synthetisierten Proteine scheinen also Glykoproteine zu sein. Ausnahmen sind Myosin (7), Aktin (8) und Protein 12 (Pallidin wird unten besprochen).

Alle in Tab. 4 aufgeführten Glykoproteine mit Ausnahme von 18, das nur mit  $^3\text{H}$ -Fukose markiert wird, bauen  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin ein. Die Raten und Perioden des Einbaus sind meist gleich oder sehr ähnlich wie jene der  $^{14}\text{C}$ -Acetatmarkierung. Dieser Vergleich ist nicht möglich bei Banden, die nahe bei Aktin oder Myosin liegen (17,19,31), da beide Proteine ständig intensiv mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat markiert werden und schwächere Banden im Autoradiogramm überstrahlen.

Einige Unterschiede im Muster von Glukosamin- und Acetatmarkierung sind erwähnenswert:

In Phase I dominieren bei Glukosaminmarkierung 3 Banden: Protein 17, eine Doppelbande, gehört zu jenen, die mit Acetat nicht deutlich auszumachen sind. Protein 13 ist mit Glukosamin viel stärker markiert als mit Acetat, Protein 11 wenig stärker.

In späteren Differenzierungsphasen gleichen sich die Muster stärker. Bei einigen Proteinen (z.B. Nr. 16, 20, 30) treten die maximalen Einbauraten von Glukosamin gegenüber Acetat etwas verzögert auf.

In der Region von Pallidin (9) sind wahrscheinlich zwei Proteine vorhanden: Pallidin selbst, das mit Acetat immer markiert wird, aber keine Zucker enthält (Simpson et al., 1975), und ein Glykoprotein (10), das vor allem während Phase I mit Glukosaminfütterung sichtbar wird.

Als Kontrolle der PM-Isolierungsmethode mit Con A und Triton (s. 2.2.1.1) werden  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin-markierte PM auch mit Diginonin isoliert (s. 2.2.1.2). Drei Phasen werden unterschieden:

- 0-2 h nach Futterentzug (= Phase I wie oben)
- 2-5 h nach Futterentzug (= 1 h länger als Phase II)
- 5-7½ h nach Futterentzug (= Phase IV)

Fig. 22 zeigt, dass das Markierungsmuster dieser PM gut mit demjenigen der normal isolierten PM übereinstimmt.

Legende zu den Figuren 23 und 24

Fig. 23  $^3\text{H}$ -Fukose-Markierung von Zellen in verschiedenen Differenzierungsstadien; Autoradiogramme der PM-Proteinmuster, Zahlen : Nummern aus Tab. 4.

Fig. 24 Nachweis von antigenischen Proteinen im Polyacrylamid-Gel. Das Gel in Fig. 24a wurde mit Antiserum gegen vegetative Zellen, jenes in Fig. 24b mit Antiserum gegen aggregierte Zellen behandelt. In beiden Gelen sind die gleichen Proben aufgetragen (von links nach rechts): PM von vegetativen Zellen, PM von aggregierten Zellen, Butanolextrakt aus aggregierten Zellen (2 Präparationen bei b).

Die Markierungsmuster von  $^3\text{H}$ -Fukose haben erwartungsgemäss Aehnlichkeiten mit dem  $^{14}\text{C}$ -Glukosaminmuster, zeigen aber doch einige markante Unterschiede (Fig. 23):

Das Glykoprotein (10) mit der gleichen Laufgeschwindigkeit wie Pallidin (9) wird mit Fukose während der ganzen Differenzierung deutlich markiert, mit Glukosamin nur gerade am Anfang der Aggregation. Protein 11 wird, wie mit Acetat und Glukosamin, auch mit Fukose dauernd markiert. Das Einbaumaximum tritt jedoch erst in den Phasen III und IV auf, bei Acetat und Glukosamin schon in Phase I.

Zwei auffällige Banden auf Autoradiogrammen von Acetat- und Glukosaminmarkierungen, Proteine 15 und 21, werden mit Fukose nur sehr schwach markiert. Drei weitere Glykoproteine, Nr. 22, 23 und 30, fehlen bei Fukosemarkierung gänzlich, möglicherweise enthalten sie diesen Zucker nicht.

Das Glykoprotein 18 ist nur mit  $^3\text{H}$ -Fukose eindeutig identifizierbar; es fehlt bei Glukosaminmarkierungen und ist bei Acetatfütterung nur in wenigen Fällen von Aktin getrennt.

In späten Differenzierungsstadien (v.a. IV) fallen starke Markierungen mit  $^3\text{H}$ -Fukose im Bereich oberhalb von Myosin auf.

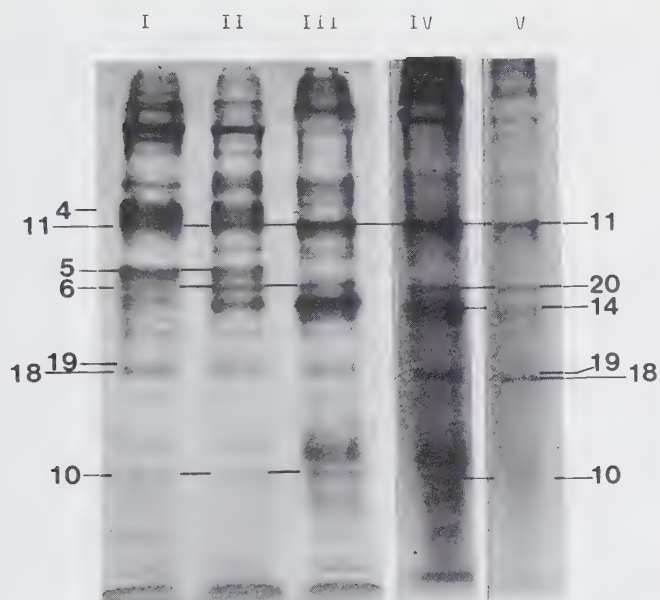


Fig. 23

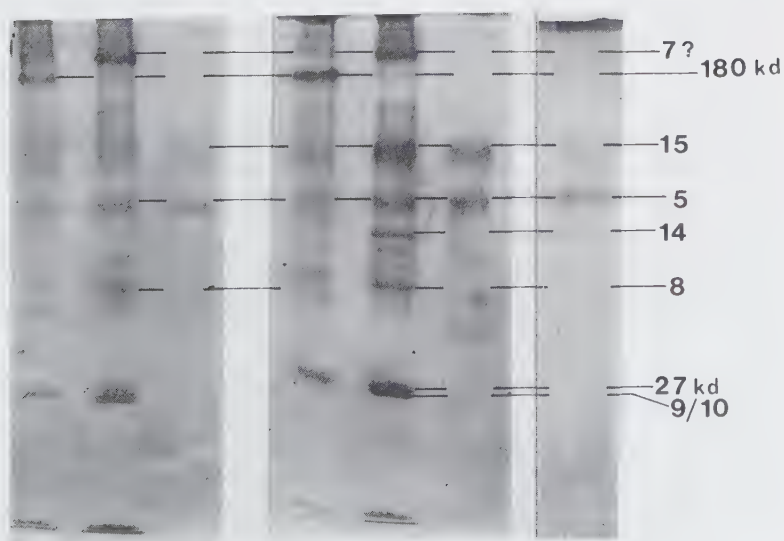


Fig. 24a

Fig. 24b

Sie können den Banden der andern beiden Markierungen nicht eindeutig zugeordnet werden. Keine dieser Fukosebanden stimmt mit Protein 22 überein.

### 3.4.3 Antigene und potentielle Kontaktproteine

Da die Präparation von Antiseren und der Nachweis von Antigenen im Polyacrylamidgel relativ aufwendig sind (s. 2.3.3), werden hier nur zwei Differenzierungsstadien unterschieden: vegetative und aggregierte Zellen. Die aggregierten Zellen befinden sich in der Phase II (s. oben), haben sich also während 4-4½ h auf Millipore-Filtern entwickelt.

Fig. 24a zeigt PM beider Stadien, angefärbt mit Antiserum gegen vegetative Zellen (= Antiserum 1); in Fig. 24b ist das Antiserum gegen aggregierte Zellen (= Antiserum 2) verwendet worden. Das Behandeln mit den zwei verschiedenen Antiseren bringt fast keine qualitativen Veränderungen des Musters mit sich, die Intensität einzelner Banden ist jedoch grösser nach Behandlung mit Antiserum 2. Da in einer grossen Population von Zellen nie alle im gleichen Zustande sind, ist es nicht erstaunlich, dass stark antigenische Proteine mit beiden Seren nachgewiesen werden können. Die einzige Ausnahme bildet Protein 14, das nur mit Antiserum 2 bei PM von aggregierten Zellen angefärbt wird. Das bestätigt die Vermutung (s. 3.4.1), dass sich an der Stelle von Protein 14 im Gel zwei Proteine mit ähnlichem MG befinden (s. Tab. 4).

Zur Identifizierung der einzelnen Antigenbanden werden in einem Gel mit <sup>14</sup>C-Glukosamin-markierten PM aus 5 verschiedenen Stadien die Antigene nachgewiesen. Trotz fehlender PPO-Behandlung zeigt das Autoradiogramm die wichtigsten Markierungen, die nun mit den Antigenbanden verglichen werden können.

Bei PM von vegetativen wie von aggregierten Zellen sind Aktin (8), Con A und Pallidin (9) deutlich sichtbar. Die Färbung von Con A kann nicht auf der Antigenizität dieser Substanz beruhen, da die den Kaninchen gespritzten Membranen ohne Con A präpariert wurden. Bei PM-Fraktionen von D. discoideum ist Con A

durch die Antikörperfärbung nicht nachweisbar (Parish et al., 1978b). Daher wird angenommen, dass sich bei *P. pallidum* ein antigenisches Membranprotein im gleichen Gelbereich wie Con A befindet. Die Antigenizität von Aktin und Pallidin nimmt während der Aggregation leicht zu.

Während der Differenzierung von vegetativen zu aggregierenden Zellen ergeben sich auch auffälligeren Veränderungen im Antigenmuster der PM. Ein Hauptantigen der vegetativen PM hat eine Grösse von ca. 180 kd, die Bande liegt etwas unterhalb von Myosin. Sie kann nicht eindeutig einer Bande der Markierungsexperimente zugeordnet werden, da die Position der Proteine in diesem Gelbereich relativ stark von der Menge des Myosins beeinflusst wird. Der Myosingehalt ist von Probe zu Probe verschieden. Das beschriebene Antigen verschwindet fast ganz aus der PM von aggregierenden Zellen; dafür tritt eine starke Antigenbande im Bereich von Myosin auf. Es kann sich um Myosin selbst handeln, wenn angenommen wird, seine Antigenizität verstärke sich (wie jene von Aktin) im Laufe der Aggregationsphase. Das neu erscheinende Antigen könnte aber auch einem Protein mit ähnlicher Grösse wie Myosin zugeordnet werden. Während der Aggregationsphase werden im Bereich von 210 kd neben Myosin auch Glykoproteine synthetisiert (z.B. Nr. 31 in Tab. 4; s. auch Fig. 21 und 23).

Die Proteine 5, 14 und 15 bilden die interessanteste Gruppe von Antigenen. 5 und 15 sind bei PM von aggregierten Zellen viel stärker angefärbt als bei vegetativen, Protein 14 fehlt als Antigen im vegetativen Stadium gänzlich (s. Fig. 24). Die Proteine 5 und 15, in einigen Versuchen auch 14, können durch eine Extraktion mit Butanol (s. 2.2.2) aus der PM von aggregierten Zellen isoliert werden (Fig. 24; s. Diskussion 4.6.2).

## 4 DISKUSSION

### 4.1 Isolierung der Plasmamembran (PM)

Das Hauptziel der vorliegenden Arbeit ist die Charakterisierung der PM von *P. pallidum*. Bei dieser Zielsetzung muss eine schnelle und reproduzierbare Methode zur Isolierung der PM zur Verfügung stehen. Die von Parish und Müller (1976) für *D. discoideum* beschriebene Methode erweist sich auch für *P. pallidum* als geeignet (Philippi, 1978). Die Verwendung von Con A zur Stabilisierung der PM und Triton X-100 zur Lyse der Zellen wird auch von Condeelis (1979) beschrieben, der die Methode von Parish und Müller (1976) mit kleinen Modifikationen übernommen hat.

Mit der genannten Methode ist es möglich, innert 15 min zu einer PM-Fraktion zu gelangen, die im Vergleich zu andern Methoden einen hohen Reinheitsgrad aufweist. Allerdings muss erwähnt werden, dass die Verwendung von Triton Nachteile mit sich bringt. Leicht lösliche Proteine könnten bei der Behandlung mit Triton von der PM abgelöst werden und so verloren gehen. Ausserdem muss mit einer Hemmung jener Enzyme gerechnet werden, die als Lipoproteine vorliegen. Dies ist z.B. bei der Alkalischen Phosphatase der Fall (Parish, unveröffentlicht).

Mit Digitonin lassen sich bei *D. discoideum* ebenfalls Membranghosts erzeugen (Riedel und Gerisch, 1968). Dies gelingt auch mit Myxamöben von *P. pallidum*. Die Methode liefert im Acrylamidgel sehr ähnliche Proteinmuster und wird daher zu Vergleichszwecken beigezogen (s. 3.1 und 3.4.2).

Siu et al. (1977) beschreiben eine Methode, bei der  $ZnCl_2$  zur Stabilisierung der PM von *D. discoideum* verwendet wird. Bei der nachfolgenden Homogenisation führt dies zu Verklumpungen von verschiedenen Zellkomponenten und damit zu unbefriedigenden Resultaten.

Verschiedene Autoren beschreiben eine Reinigung von PM mittels Gradientenzentrifugation, ausgehend von einem Homogenat von *D. discoideum* Myxamöben. Die Lyse der Zellen wird auf unterschied-

liche Weise erreicht: Durch Einfrieren und Auftauen (Green und Newell, 1974), Zugabe des Antibiotikums Amphotericin B (Rosso-mando und Cutler, 1975), Homogenisieren in einem Glasgefäß mit Stößel (McMahon et al., 1977) oder Durchpressen durch eine Spritze (Gilkes und Weeks, 1977). Bei allen genannten Methoden folgt eine Reinigung über mehrere Zentrifugations-schritte, was einen Zeitaufwand von einigen Stunden (Green und Newell, 1974) bis 1½ Tage (McMahon et al., 1977) erfordert. Schon aus zeitlichen Gründen eignen sich diese Methoden also schlecht für die routinemässige Isolierung von PM. Aus eigen-ten früheren Arbeiten (Hintermann, 1974) geht hervor, dass es schwierig ist, mittels Dichtegradienten-Zentrifugation zu einer reinen PM-Fraktion von *D. discoideum* zu gelangen. Dies trifft auch für *P. pallidum* zu (Philippi, 1978).

#### 4.2 Methoden zur Markierung der Zelloberfläche

Die Aussenseite der PM (Zelloberfläche) unterscheidet sich von der cytoplasmatischen Seite der PM (Singer und Nicolson, 1972; Trams und Lauter, 1974). Für den Zell-Zellkontakt ist es wichtig, welche PM-Proteine nach aussen exponiert sind. 4 Methoden zur Markierung der Zelloberfläche werden ausgewählt und auf die PM von Zellen der stationären Phase angewendet:

$^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase (Marchalonis et al., 1971)

$^{14}\text{C}$ -Dinitrofluorbenzol (DNFB; Sievers et al., 1978)

Fluorescamin (Cross und Briggs, 1977)

$^3\text{H}$ -NAP<sub>4</sub> (Lauquin et al., 1978)

Aus Tab. 1 ist ersichtlich, dass alle Substanzen leicht unterschiedliche Markierungsmuster produzieren.

Die Behandlung der Zellen mit  $\text{Na}^{125}\text{I}$  und Lactoperoxidase erzeugt im Autoradiogramm im Vergleich zu den übrigen Methoden wenig Banden (8). Mit dieser Methode können nur Proteine markiert werden, die in ihrem exponierten Teil Tyrosin enthalten. Wird ein Protein aber iodiert, befindet es sich mit grosser Wahrscheinlichkeit an der Aussenseite der PM, denn Lactoperoxidase dringt während der Inkubationszeit von 20 min kaum

in ganze Zellen ein (Marchalonis et al., 1971).

Ein Nachteil bei der Verwendung von  $^{125}\text{I}$  besteht darin, dass die Banden im Autoradiogramm weniger scharf sind als bei  $^{14}\text{C}$  und  $^3\text{H}$ , somit ist die Identifizierung des markierten Proteins auf dem Gel etwas erschwert.

Durch  $^{14}\text{C}$ -DNFB werden mindestens doppelt so viele Banden erzeugt wie durch  $^{125}\text{I}$ . Dies kann darauf beruhen, dass nicht alle Oberflächenproteine Tyrosin enthalten. Es muss jedoch auch berücksichtigt werden, dass DNFB ein lipophiles Molekül ist, das vor seiner schnellen Reaktion mit Proteinen in die Lipidschicht der Membran eindringen könnte. Dies wird noch erleichtert durch die Anwesenheit von 1-5% Aethanol bei der Markierung. Aethanol wird als Lösungsmittel für DNFB gebraucht. Dass jedoch nicht alle in grösserer Menge vorliegenden Proteine markiert werden, ist an Aktin und Myosin ersichtlich. Beide werden nur bei Behandlung i s o l i e r t e r PM markiert. Dies stimmt mit den Resultaten der andern drei Methoden überein, wenn man davon absieht, dass Fluorescamin in der hohen Konzentration von 1,2 mg/ml auch Aktin und Myosin leicht zum Fluoreszieren bringt.

Fluorescamin ist wie DNFB ein lipophiles Molekül. Es wird in Aceton gelöst. Bei der Behandlung der Zellen ist Aceton in einer Konzentration von 3% vorhanden. Dies kann eine Schädigung der PM und ein besseres Eindringen von Fluorescamin in die Zelle zur Folge haben. Ein weiterer Nachteil dieser Methode sind die diffusen Fluoreszenzbanden, die eine Identifizierung des markierten Proteins auf dem Gel erschweren.

Das lichtsensitive Molekül  $\text{NAP}_4$  ist wasserlöslich. Hier muss also nicht mit einer Schädigung der PM durch Lösungsmittel gerechnet werden. Die Markierung ganzer Zellen mit  $\text{NAP}_4$  ist als Kontrolle zu den Versuchen mit  $\text{NAP}_4$ -ATP und  $\text{NAP}_4$ -AMP durchgeführt worden. Das Muster des Autoradiogramms stimmt gut mit jenem von  $^{14}\text{C}$ -DNFB überein (s. Tab. 1). Auch  $\text{NAP}_4$  erzeugt bei Behandlung ganzer Zellen keine Markierungen in Aktin und Myosin. Wird ein Protein durch  $\text{NAP}_4$  und DNFB von aussen markiert, wird dies als Hinweis dafür genommen, dass dieses Protein an der Zelloberfläche exponiert ist.

#### 4.3 Versuche zur Identifizierung von ATP- und AMP-bindenden Proteinen der PM

Da sich an der Oberfläche der Zellen von *P. pallidum* eine ATP'ase (s. 3.3.1), eine Proteinkinase (s. 3.3.2) und eine AMP'ase (= Alkalische Phosphatase) nachweisen lassen, wird versucht, ATP- und AMP-bindende Proteine der PM zu identifizieren. Die Resultate der Bindungsversuche mit  $^3\text{H-NAP}_4\text{-ATP}$  und  $^3\text{H-NAP}_4\text{-AMP}$  (s. 3.2.3) haben gezeigt, dass auch  $\text{NAP}_4$  selbst Bindungsaffinitäten zu verschiedenen PM-Proteinen besitzt, was die Erfassung von ATP- und AMP-bindenden Proteinen verunmöglicht. Erwähnenswert ist jedoch, dass Myosin bei Behandlung isolierter PM mit  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  am stärksten markiert wird;  $\text{NAP}_4$  und  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$  werden von Myosin kaum gebunden. Die Bindungsspezifität scheint hier auf dem ATP-Rest zu beruhen.

Die Methode ist von Lauquin et al. (1978) zur Identifizierung des Adeninnukleotid-Carriers in der inneren Mitochondrienmembran verwendet worden. Ein wesentlicher Vorteil bestand hier darin, dass die  $K_m$ -Werte für Adeninnukleotide bekannt sind. Die Konzentration von  $\text{NAP}_4\text{-ADP}$  konnte daher genau dosiert werden, die Gefahr der Unter- oder Uebersättigung des Carriers fiel weg. So konnten die unspezifischen Markierungen auf ein Minimum reduziert werden. In der PM von *P. pallidum* befinden sich keine Proteine mit bekanntem  $K_m$  für Adeninnukleotide. Die Konzentration der  $\text{NAP}_4$ -Moleküle kann daher nicht auf eine bestimmte Bindungsaffinität abgestimmt werden.

Durch Zusatz des ATP'asen-Hemmstoffes Suramin (Fortes et al., 1973) bei der Markierung wird versucht, die für Adeninnukleotide spezifischen Proteine von andern zu unterscheiden. Entgegen den Erwartungen hemmt Suramin aber nicht spezifisch die Markierung einzelner Banden, sondern mehr oder weniger stark alle Banden, und dies bei allen drei verwendeten Substanzen ( $\text{NAP}_4$ ,  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  und  $\text{NAP}_4\text{-AMP}$ ).

Eine weitere Möglichkeit, die Spezifität der Markierung durch  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  zu prüfen, ist die Zugabe eines Ueberschusses an unmarkiertem ATP.  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  sollte dadurch von jenen Proteinen verdrängt werden, die das Molekül aufgrund seines ATP-Restes

gebunden haben. Die Resultate dieser Versuche sind ebenfalls schwierig zu interpretieren. Deutliche Hemmungen durch ATP sind nicht feststellbar. Interessanterweise sind dafür Banden zu beobachten, deren Markierung durch Zusatz von ATP oder ADP drastisch erhöht wird. Dies gilt z.B. bei der Markierung isolierter PM mit  $\text{NAP}_4$  (Zusatz: 10 mM ATP) und mit  $\text{NAP}_4$ -AMP (Zusatz: 10 mM ADP). Adeninnukleotide scheinen also die Konformation einiger Proteine so zu verändern, dass ihre Affinität zu  $\text{NAP}_4$ -Derivaten steigt. Besonders deutlich ist der Effekt bei Aktin und Myosin zu beobachten. Es wäre möglich, dass  $\text{NAP}_4$ -Derivate eine höhere Affinität zu polymerisiertem Aktomyosin als zu den Monomeren besitzen. Dies wird durch eine Beobachtung von Nachmias (1976) unterstützt, die gezeigt hat, dass AMP und ATP in einem Zellextrakt von *Physarum* die Bildung von Aktomyosinfilamenten induzieren.

#### 4.4 Aktin und Myosin

Die beiden Proteine sind die einzigen identifizierten Bestandteile der PM von *P. pallidum*. Sie kommen in grosser Menge vor (s. 3.1), und es wird angenommen, dass sie für Form und Bewegung der Myxamöben und somit auch für die Differenzierung von Bedeutung sind.

Aktin und Myosin finden sich bei vielen Organismen auch ausserhalb des Muskelgewebes (Pollard und Weihing, 1974). Die beiden Proteine bauen ein Netzwerk aus Mikrofilamenten auf, das z.T. auf der Innenseite der PM verankert ist (Lazarides, 1976; Nicolson, 1976). Die Mikrofilamente durchziehen meistens die ganze Zelle und bilden zusammen mit den Mikrotubuli das Cytoskelett (Lazarides und Revel, 1979). Bei *P. pallidum* scheint ein Teil dieses Cytoskeletts mit der PM isolierbar zu sein; die grosse, aber nicht ganz konstante Menge von Aktin und Myosin in der PM-Fraktion könnte dadurch erklärt werden. In wenigen Fällen wird eine Exponierung der beiden Proteine an der Zelloberfläche beschrieben, so für Aktin bei Lymphocyten (Owen et al., 1978) und für Myosin bei Fibroblasten (Olden et

al., 1976). Die eigenen Resultate deuten auf eine Lokalisation von Aktin und Myosin auf der Innenseite der PM.

Aktin und Myosin sind in vielen Systemen für die Zellbewegung von Bedeutung (Goldmann et al., 1976; Wohlfarth-Bottermann, 1977). Dies dürfte auch für *P. pallidum* zutreffen. Da Aktin und Myosin während des ganzen Lebenszyklus von *P. pallidum* synthetisiert werden (s. 3.4.1), ist auch eine Beteiligung an morphogenetischen Bewegungen während der Fruchtkörperbildung wahrscheinlich. Einzelne Zellen bewegen sich innerhalb des Pseudoplasmodiums: Präsumptive Stiel- bzw. Sporenzellen werden bei *D. discoideum* z.T. auf diese Weise voneinander separiert ("sorting-out"; Müller und Hohl, 1973; Durston und Vork, 1979).

Neben der Bedeutung für die Zellbewegung ist auch eine Beteiligung von Aktin und Myosin am Prozess der Phagocytose denkbar.

Der Aktomyosinkomplex hat die Fähigkeit, ATP zu spalten (Mannherz und Goody, 1976). Die an der Zelloberfläche von *P. pallidum* nachgewiesene ATPase ist aber kaum identisch mit der Aktivität von Aktomyosin. Die Markierungsversuche mit  $\text{NAP}_4\text{-ATP}$  haben gezeigt, dass Myosin zwar eine Bindungsaffinität für dieses Molekül besitzt, aber nur markiert wird, wenn isolierte PM statt ganzer Zellen behandelt werden.

In vielen Systemen werden die leichten Ketten von Myosin phosphoryliert (Mannherz und Goody, 1976). Bei *D. discoideum* sind die schweren Ketten Akzeptoren von Phosphatgruppen (Parish et al., 1977b; Rahmsdorf et al., 1978, 1979). Dies ist auch bei *P. pallidum* der Fall (s. 3.3.2). Während Parish et al. eine Phosphorylierung nach Inkubation ganzer Zellen von *D. discoideum* mit  $^{32}\text{P}\text{-ATP}$  feststellen, finden Rahmsdorf et al. nur eine Markierung von Myosin, wenn sie ein Lysat von Zellen behandeln. Die eigenen Resultate bestätigen an *P. pallidum* eine Phosphorylierung des Myosins von aussen. Da angenommen wird, Myosin liege auf der cytoplasmatischen Seite der PM, setzt die Phosphorylierung von Myosin eine Proteinkinase an der Zelloberfläche voraus. Dieses Enzym würde energiereiche Phosphatgruppen direkt oder über eine gekoppelte Permease in die Zellen hinein-

transportieren. Bei *D. discoideum* wurde die Proteinkinase-aktivität intakter Zellen auch von Weinstein und Koritz (1973) und von Mato und Konijn (1976) nachgewiesen.

Die Phosphorylierung von Myosin könnte eine Kopplung des chemotaktischen mit dem kontraktilen System der Zellen darstellen. Dies wird bei *D. discoideum* von Rahmsdorf et al. (1978) postuliert, die nach einem cAMP-Puls eine erhöhte Phosphorylierung von Myosin erhalten.

#### 4.5 Adenylylcyclase

Die Adenylylcyclase ist ein weit verbreitetes Enzym. Sie kommt bei Bakterien (Pastan und Perlman, 1971), Protozoen (Chlapowski und Butcher, 1973), Algen (Amrhein, 1977) und tierischen Organismen vor (Greengard und Costa, 1970). Hingegen wird deren Existenz bei höheren Pflanzen in letzter Zeit eher bezweifelt (Amrhein, 1977; Hintermann und Parish, 1979).

Bei höheren Organismen scheint die Adenylylcyclase meistens mit der PM assoziiert zu sein (Sutherland et al., 1962; Greengard und Costa, 1970). Weitere Autoren weisen das Enzym aber auch in verschiedenen anderen Organellen nach, so z.B. in Kernfraktionen von Rattenleber (Soifer und Hechter, 1971), in Mitochondrien der Nebennierenrinde des Rindes (Hechter et al., 1969) und im rauen ER von *Acanthamoeba* (Chlapowski und Butcher, 1973).

Bei *D. discoideum* wird die Adenylylcyclase als plasmamembrangebundenes Enzym beschrieben (Farnham, 1975; Rossomando und Cutler, 1975). In eigenen Untersuchungen mit *D. discoideum* und *P. pallidum* kann dies jedoch nicht bestätigt werden (s. 3.3.3.4). Die Resultate deuten auf die Assoziierung des Enzyms mit einer Membranfraktion, die nicht aus PM besteht und eine geringe Dichte von durchschnittlich  $1,123 \text{ g/cm}^3$  aufweist. Ein kleiner Teil der Aktivität befindet sich in Kernfraktionen; dies könnte aber auf Verunreinigungen zurückzuführen sein.

Farnham (1975) hat die Adenylylcyclase cytochemisch auf der Innenseite der PM nachgewiesen. Versuche, seine Arbeit in unse-

rem Labor zu reproduzieren, verliefen unbefriedigend (Müller, unveröffentlicht); es traten zu viele unspezifische Präzipitationen in den Zellen auf.

Die Resultate von Rossomando und Cutler (1975) stehen nicht nur in bezug auf die Lokalisierung des Enzyms in Widerspruch zu den eigenen Ergebnissen. Die von den genannten Autoren beschriebene Methode zur Isolierung von PM dauert etwa 24 h und beginnt mit einer Inkubation zur Lyse der Zellen bei 22°C während 60 min. In eigenen Untersuchungen (s. 3.3.3.1) ist die Adenylylcyclase sehr temperaturempfindlich. So ergibt sich nach Inkubation eines Zellhomogenats während 30 min bei 23°C ein Aktivitätsverlust von 50-70%, nach Aufbewahren des Homogenats während 24 h bei 4°C ein Verlust von 70-90%. Die Zellfraktionierungen der vorliegenden Arbeit werden alle bei 4°C durchgeführt und dauern höchstens 8 h. Diese methodischen Unterschiede müssten bei Rossomando und Cutler (1975) zu grösseren Aktivitätsverlusten der Adenylylcyclase führen. Sie beschreiben jedoch eine spezifische Aktivität von 1100 pMol/mg Protein  $\times \text{min}^{-1}$  in ihrer Membranfraktion. Dem steht in der vorliegenden Arbeit eine Aktivität von 2-3 pMol/mg Protein  $\times \text{min}^{-1}$  gegenüber.

Auch Klein (1976) beschreibt die Temperatursensitivität der Adenylylcyclase von *D. discoideum*. Sie findet nach 6 min Inkubation bei 27°C einen Aktivitätsverlust von 50%. Rossomando und Cutler dagegen erhalten bei 30°C während 20 min eine lineare cAMP-Synthese.

Die genannten Widersprüche bleiben vorerst ungeklärt, stellen aber doch die These einer PM-gebundenen Adenylylcyclase in Frage.

Das elektronenmikroskopische Bild der Membranen mit der höchsten Adenylylcyclase-Aktivität zeigt eine recht homogene Vesikelfraktion (Fig. 18). Maeda und Gerisch (1977) haben beobachtet, dass Vesikeln gleicher Grösse (bis 0,2  $\mu\text{m}$ ) in Zellen von *D. discoideum* auftreten und mit der PM verschmelzen, wenn die Zellen einen cAMP-Puls aussenden. Sie vermuten daher, dass diese Vesikeln cAMP enthalten, das durch Exocytose ausgeschieden wird.

Die Adenylylcyclase könnte mit den Vesikeln assoziiert sein. Die Verteilung dieser Strukturen im Dichtegradienten entspricht jener der Adenylylcyclase. Allerdings dürfen zwei Punkte nicht ausser acht gelassen werden:

- 1) Die PM enthält höchstens eine geringe Adenylylcyclase-Aktivität. Wenn die genannten Vesikeln mit der PM fusionieren (Maeda und Gerisch, 1977), muss also ihre Membran rasch wieder aus der PM entfernt oder das Enzym inaktiviert werden.
- 2) Die Lokalisation der Adenylylcyclase ist bei *D. discoideum* und bei *P. pallidum* gleich, obwohl cAMP bei *Polysphondylium* nicht als Acrasin wirkt (Bonner et al., 1972). Es gibt jedoch Hinweise auf eine chemotaktische Funktion von cAMP bei migrierenden Pseudoplasmodien von *P. pallidum* (Jones und Robertson, 1976).

Obwohl die Vesikeln im Dichtegradienten mit grosser Wahrscheinlichkeit die Träger der Adenylylcyclase sind und auch die gleiche Grösse wie die von Maeda und Gerisch beschriebenen Vesikeln besitzen, ist die Identität der beiden Strukturen vorerst nicht zu beweisen. Die Vesikeln im Gradienten könnten sogar auch Homogenisationsartefakte sein (De Pierre und Karnovsky, 1973).

Die endgültige Lokalisierung der Adenylylcyclase bei den Acrasiales steht also noch aus. Ob der Nachweis der postulierten Vesikeln mit Adenylylcyclase-Aktivität *in vivo* gelingt, hängt von der Entwicklung zuverlässiger cytochemischer Methoden ab.

Die Aktivität der Adenylylcyclase von *D. discoideum* steigt während der Differenzierung der Zellen stark an. Klein (1976) fand bei aggregierenden Myxamöben eine 40x höhere Aktivität als bei vegetativen. Die eigenen Untersuchungen ergeben eine Steigerung um den Faktor 10 (s. 3.3.3.3). Der Unterschied kann darauf beruhen, dass bei Klein der axenische Stamm Ax-2, in der vorliegenden Arbeit der Wildstamm NC-4 (H) verwendet wurde.

Da bei *P. pallidum* cAMP nicht als Acrasin dient (Bonner et al., 1972), ist der nur unwesentliche Anstieg (2x) der Aktivität der Adenylylcyclase während der Differenzierung verständlich. Ferner kann angenommen werden, dass der Gesamtproteingehalt der Zellen wie bei *D. discoideum* während der Differenzierung

sinkt (Loomis, 1975). So scheint es sinnvoller, die Enzymaktivität auf die Zellzahl statt auf den Proteingehalt zu beziehen. Auf diese Weise betrachtet bliebe die Aktivität während der Differenzierung von *P. pallidum* praktisch konstant.

Bei *D. discoideum* ist bekannt, dass die Adenylylcyclase von aggregationsreifen Zellen in Abständen von 5-9 min periodisch aktiviert wird (Roos und Gerisch, 1976; Klein et al., 1977; Roos et al., 1977). Die Zugabe von  $2 \times 10^{-7} \text{M}$  cAMP zu einer Zellsuspension bewirkt eine Aktivierung der Adenylylcyclase während ca. 1 min (Roos und Gerisch, 1976). Es werden auch andere gegenseitige Beeinflussungen im Metabolismus von Adenosin, AMP, ADP, ATP und cAMP an der PM von *D. discoideum* beobachtet (Rossomando und Sussman, 1973; Rossomando und Hesla, 1976; Parish, unveröffentlicht). Bei höheren Organismen ist bekannt, dass Adenosin und Adenosinanalogue die Aktivität der Adenylylcyclase beeinflussen (Sahyoun et al., 1976; Londos und Wolff, 1977; Prémont et al., 1977a+b). Aufgrund der erwähnten Tatsachen schien es interessant, den Einfluss von Adenosin und einigen Analogen auf die Adenylylcyclase von *D. discoideum* und *P. pallidum* zu untersuchen. Die Resultate (s. 3.3.3.2) zeigen jedoch so vielfältige und von der Literatur abweichende Effekte, dass eine Interpretation nicht möglich ist. Die Ergebnisse weisen aber auf wesentliche Unterschiede zwischen der Adenylylcyclase von *D. discoideum* und *P. pallidum* und jener von tierischen Organismen hin. Die Verschiedenheit der Enzyme ist auch daraus ersichtlich, dass NaF die Adenylylcyclase von *D. discoideum* nicht beeinflusst (Roos und Gerisch, 1976) oder sogar leicht hemmt (s. 3.3.3.2), die Aktivität bei höheren Organismen jedoch steigert (Greengard und Costa, 1970).

#### 4.6 Veränderungen der PM während der Differenzierung

Besondere Aufmerksamkeit verdient die Bedeutung der PM im Differenzierungsprozess von *P. pallidum*. Nach erfolgter Charakterisierung werden daher im folgenden die Veränderungen in der Zusammensetzung der PM beschrieben (s. 3.4), wie sie sich im Laufe der Zelldifferenzierung beobachten lassen. Ausserdem

wird versucht, einzelnen der neu synthetisierten Proteine eine Funktion im Zell-Zellkontakt zuzuordnen (s. 4.6.2).

#### 4.6.1 Änderungen im Proteinmuster der PM

Zur Feststellung von Veränderungen im Proteinmuster werden ganze Zellen mit radioaktiven Metaboliten gefüttert ( $^{14}\text{C}$ -Acetat,  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin,  $^3\text{H}$ -Fukose), die PM isoliert und durch Elektrophorese in Polyacrylamidgelen aufgetrennt. Die gleiche Methode wurde bei *D. discoideum* von Parish und Schmidlin (1979a) angewendet. Siu et al. (1977) machten identische Untersuchungen, markierten jedoch mit  $^{35}\text{S}$ -Methionin. Francis (1976) fütterte *Myxamöben* von *P. pallidum* mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat und trennte anschliessend einen Gesamtproteinextrakt elektrophoretisch auf. Er beschreibt 24 Proteine, deren Synthese sich im Verlauf der Fruchtkörperbildung ändert. Die vorliegende Arbeit unterscheidet 32 Proteine der PM, darunter 9, die während des ganzen Entwicklungsprozesses synthetisiert werden; 23 Proteine werden nur während bestimmter Differenzierungsstadien mit radioaktiven Metaboliten markiert (s. Tab. 4).

Obwohl die Markierungsmuster im Gesamtproteinextrakt von Francis (1976) recht komplex sind, lassen sich darin einige der wichtigsten PM-Proteine erkennen, bei denen die Synthesephasen mit den von Francis beschriebenen übereinstimmen. Es handelt sich um die Proteine mit folgendem MG (in kd; in Klammern ist das von Francis genannte MG angegeben): 300 (300), 210 (220, Myosin), 110 (110), 57 (58), 42 (44, Aktin), 34 (33), 24 (23).

Die Synthese von mindestens 6 Membranproteinen hört vor Beendigung der Fruchtkörperbildung auf (s. Tab. 4). Langzeitmarkierungen zeigen, dass auch diese Proteine in der PM bleiben und nicht etwa abgebaut werden. Bei *D. discoideum* finden sich jedoch einige Proteine, die während der Entwicklung aus der PM verschwinden (Siu et al., 1977). Parish und Schmidlin (1979a) weisen dies für die "Contact Sites A" (Huesgen und Gerisch, 1975) nach.

Die in Tab. 4 beschriebenen Proteine werden also während der Differenzierung in zeitlich festgelegten Synthesephasen in die PM eingebaut und bleiben dort bis zum letzten untersuchten Stadium, der Kulminationsphase. Zur Frage der Steuerung dieses Ablaufes bieten sich zwei verschiedene Modellvorstellungen an (Francis, 1977):

- 1) "Springtime-Hypothese": Wie die Tageslänge und die Temperatur die aufeinanderfolgenden Blütezeiten von Blumen im Frühling bestimmen, so hängt auch die Synthesephase jedes einzelnen Proteins von äusseren Kriterien ab.
- 2) "Domino-Hypothese": Das Auftreten eines bestimmten Proteins in einer bestimmten Phase der Differenzierung ist die Voraussetzung für den weiteren Ablauf der Entwicklung. Es besteht also ein "Programm", das die zeitliche Reihenfolge der verschiedenen Ereignisse im Entwicklungsprozess festlegt.

Die Arbeit mit Mutanten von *P. pallidum*, deren Entwicklung in verschiedenen Stadien blockiert ist, führt Francis (1977) zur Verwerfung der "Springtime-Hypothese". Nach diesem Modell wäre es denkbar, dass nur ein bestimmtes Protein in der Entwicklung fehlt; Francis findet jedoch, dass der Ausfall eines Proteins auch die Synthese aller späteren Proteine verhindert.

Zur gleichen Ansicht gelangt Loomis (1975) durch seine Arbeiten mit stadienspezifisch synthetisierten Enzymen von *D. discoideum*.

#### 4.6.2 Zell-Zellkontakt (Zelladhäsion)

Die Zelladhäsion spielt eine wichtige Rolle bei der Embryonalentwicklung höherer Organismen, wobei Rezeptoren an der Zelloberfläche und diffundierende Substanzen im extrazellulären Raum beteiligt sind (Hausman und Moscona, 1976; Rutishauser et al., 1976; Noll et al., 1979). Für den Zell-Zellkontakt bei *D. discoideum* gibt es zwei Erklärungsversuche:

Rosen et al. (1973) haben ein lektinartiges Protein (Discoidin) isoliert, dem sie eine Funktion bei der Zellaggregation zuschreiben. Es kommt in löslicher Form (Rosen et al., 1973; Siu et al., 1976) und an der Zelloberfläche gebunden vor (Chang et al., 1975; Frazier, 1976). Reitherman et al. (1975) beschreiben einen artspezifischen Rezeptor für Discoidin an der Zelloberfläche von aggregationsreifen Myxamöben. Bei einer Mutante von *D. discoideum*, die ein immunologisch aberrantes Discoidin synthetisiert, hört die Entwicklung der Zellen 3-6 h nach Futterentzug auf, es bilden sich keine Aggregate (Ray et al., 1979). Die Autoren begründen dies mit der veränderten Struktur von Discoidin, dem damit eine entscheidende Rolle in der Zelladhäsion zukäme.

Die Gruppe von Gerisch hat in verschiedenen Arbeiten die Existenz eines spezifischen Kontaktproteins ("Contact Sites A") an der Oberfläche aggregationsreifer Zellen von *D. discoideum* nachgewiesen (Beug et al., 1970, 1973; Huesgen und Gerisch, 1975; Müller und Gerisch, 1978). Die "Contact Sites A" sind nicht Bestandteile des Discoidin-Systems (Müller und Gerisch, 1978). Gerisch (1977) bezweifelt, dass Discoidin bei der Zelladhäsion eine entscheidende Rolle spielt. Er führt folgende Gründe an:

- 1) Bei einigen Stämmen von *D. discoideum* kommt Discoidin auch in vegetativen Zellen in grosser Menge vor, trotzdem aggregieren diese Zellen nicht.
- 2) Discoidin stellt 1% der löslichen cytoplasmatischen Proteine von aggregierenden Zellen dar (Siu et al., 1976). Dieser cytoplasmatische Anteil dient kaum der Zelladhäsion, seine Funktion bleibt vorerst unbekannt.
- 3) Die Lektine verschiedener Arten von Acrasiales zeigen starke Kreuzreaktionen untereinander (Reitherman et al., 1975), so dass die artspezifische Aggregation kaum auf diesen Lektinen beruhen kann.

Die von Ray et al. (1979) isolierte Mutante mit dem aberranten Discoidin ist nicht auf funktionstüchtige "Contact Sites A" untersucht worden.

Aus Zellen von *P. pallidum* ist ebenfalls ein lektinartiges Protein (Pallidin) isoliert worden (Rosen et al., 1974; Simpson et al., 1975). Es existieren auch Kontaktproteine, die funktionell den "Contact Sites A" von *D. discoideum* entsprechen (Bozzaro und Gerisch, 1978). Sie sind aber noch nicht isoliert und charakterisiert worden.

Auch bei *P. pallidum* ist die Bedeutung des Lektins umstritten. Während Rosen et al. (1975) eine wichtige Funktion für den Zell-Zellkontakt postulieren, wird dies von Bozzaro und Gerisch (1978) bezweifelt, denn sie finden nur eine geringe Beeinflussung der Zelladhäsion durch univalente Antikörperfragmente (Fab) gegen Pallidin.

Die eigenen Resultate zeigen, dass an der Zelloberfläche von *P. pallidum* ein Protein vorhanden ist, dessen MG mit dem von Pallidin (Simpson et al., 1975) übereinstimmt (s. 3.1). Es wird während allen untersuchten Stadien synthetisiert (s. Tab. 4), und seine Konzentration in der PM verändert sich kaum im Laufe der Differenzierung. Diese Tatsachen sprechen nicht für eine spezifische Kontaktfunktion während der Aggregationsphase.

Drei Proteine der PM aggregierender Zellen von *P. pallidum* weisen ähnliche Eigenschaften wie die "Contact Sites A" von *D. discoideum* auf und werden daher als potentielle Kontaktproteine betrachtet. Sie haben Molekulargewichte von 57, 71 und 110 kd (Nr. 14, 5 und 15 in Tab. 4). Die Hypothese wird von folgenden Beobachtungen gestützt:

- 1) Alle drei Proteine sind Glykoproteine (Tab. 4); auch die "Contact Sites A" besitzen einen Zuckeranteil (Müller und Gerisch, 1978; Parish und Schmidlin, 1979a).
- 2) Die drei Proteine werden vor und während der Aggregation synthetisiert (Tab. 4). Die beste Übereinstimmung mit der Synthesephase der "Contact Sites A" (Parish und Schmidlin, 1979a) zeigt das Protein mit 71 kd.
- 3) Die Proteine mit 57 und 110 kd sind an der Zelloberfläche exponiert (Tab. 1). Über die Orientierung des Proteins mit 71 kd in der PM kann nichts ausgesagt werden. Allfällige Markierungen durch  $^{125}\text{I}$ /Lactoperoxidase,  $^{14}\text{C}$ -DNFB und Fluorescamin würden mit der Bande von 70 kd zusammenfallen.

- 4) Alle drei Proteine sind stark antigenisch (Fig. 24b), was auch für die "Contact Sites A" zutrifft (Beug et al., 1970, 1973).
- 5) Die Proteine mit 71 und 110 kd, in einigen Fällen auch jenes mit 57 kd, sind mit Butanol aus der PM extrahierbar (Fig. 24b). Mit der gleichen Methode werden die "Contact Sites A" aus der PM von *D. discoideum* herausgelöst (Huesgen und Gerisch, 1975; Müller und Gerisch, 1978).
- 6) Vorversuche haben gezeigt, dass Fab-Fragmente aus dem Antiserum, das zum Nachweis der Antigene in Acrylamidgelen gebraucht wird, die Aggregation der Myxamöben von *P. pallidum* hemmen. Die Zugabe von Butanolextrakt aus aggregierenden Zellen überwindet die Hemmung (Steinemann, Hintermann und Parish, unveröffentlicht).

Ein Vergleich der Synthesephasen der drei potentiellen Kontaktproteine von *P. pallidum* lässt vermuten, dass dem Protein mit 71 kd während der Aggregation eine wichtige Bedeutung im Zell-Zellkontakt zukommt. In die beiden andern Proteine (57 und 110 kd) werden bis zur Kulminationsphase radioaktive Metaboliten eingebaut, und die stärkste Markierung findet sich erst ab Mitte Aggregation (Tab. 4). Diese beiden Proteine könnten in späteren Differenzierungsstadien für die Zelladhäsion verantwortlich sein.

#### 4.7 Hypothetisches Modell der PM von *P. pallidum*

Die Grundlage für ein Modell der PM von *P. pallidum* bildet das "Fluid Mosaic Model" von Singer und Nicolson (1972). Werden die zur Verfügung stehenden Informationen über die wichtigsten PM-Proteine von *P. pallidum* zusammengefasst, so ergibt sich das in Fig. 25 dargestellte hypothetische Modell. Es zeigt die Proteine der PM von Zellen der stationären Phase, zusätzlich sind zwei Proteine enthalten, die erst während der frühen Aggregationsphase synthetisiert werden (71 und 110 kd). Die innere Begrenzung der Lipiddoppelschicht ist gestrichelt, da sie nicht genau festgelegt werden kann. Die Aktomyosinfilamente treten wahrscheinlich mit verschiedenen integrierten Membranproteinen in Interaktion.

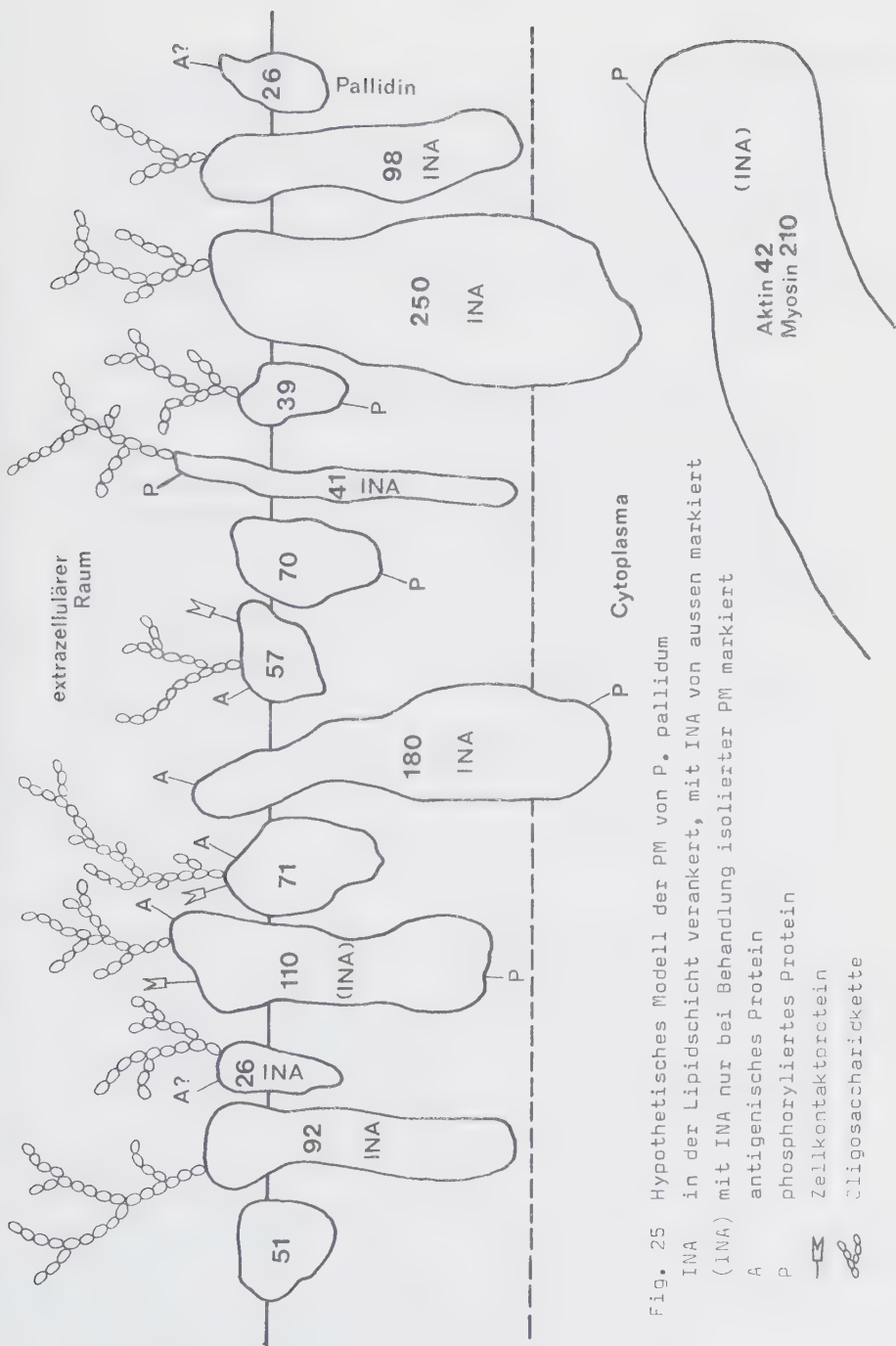


Fig. 25 Hypothetisches Modell der PM von *P. pallidum*  
 INA in der Lipidschicht verankert, mit INA von aussen markiert  
 (INA) mit INA nur bei Behandlung isolierter PM markiert

## ZUSAMMENFASSUNG

- 1) Die Plasmamembran (PM) von Polysphondylium pallidum wurde isoliert. Die dabei verwendete Routinemethode, bei der Concanavalin A und Triton X-100 gebraucht werden, liefert sehr ähnliche Resultate wie die Vergleichsmethode mit Digitonin. Andere beschriebene Methoden sind zeitlich zu aufwendig oder ergeben unreine PM-Fraktionen.
- 2) Nach Auftrennung der Proteine in 10%-Polyacrylamid-SDS-Gelen kann die PM von Zellen der stationären Phase folgendermassen charakterisiert werden:
  - a) Die meisten Membranproteine enthalten Oligosaccharidketten, sind also Glykoproteine. Davon ausgenommen sind zwei Hauptbestandteile der PM, die nach Vergleichen mit Dictyostelium discoideum und Literaturangaben als Aktin (42 kd) und Myosin (2 schwere Ketten, ca. 210 kd) identifiziert werden. Weitere starke Banden werden durch die Proteine mit 34, 51, 57, 70, 92 und 180 kd gebildet.
  - b) 13 Proteine mit Molekulargewichten von 26, 29, 39, 41, 48, 51, 57, 65, 70, 77, 92, 98 und 110 kd können mit mindestens zwei der angewendeten Methoden vom extrazellulären Raum her markiert werden. Sie sind demnach mit grosser Wahrscheinlichkeit an der Zelloberfläche exponiert.
  - c) Folgende Enzyme sind mit der PM assoziiert: Alkalische Phosphatase (= 5'-Nukleotidase), ADP'ase, ATP'ase, cAMP-Phosphodiesterase und eine oder mehrere Protein-kinasen. Der Hauptanteil der Adenylylcyclase ist mit einer wenig dichten Membranfraktion assoziiert, die nicht aus PM besteht und im Elektronenmikroskop als homogene Vesikelfraktion erscheint.

- 3) Die Synthesephasen der Membranproteine während des Entwicklungszyklus werden anhand von Einbauexperimenten mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat,  $^{14}\text{C}$ -Glukosamin und  $^3\text{H}$ -Fukose untersucht. Es werden 32 Proteine unterschieden, bei denen sich eine zeitliche Reihenfolge ihres Auftretens im Laufe der Differenzierung festlegen lässt. Mit Ausnahme von Aktin, den schweren Ketten des Myosins und einem Protein mit 70 kd werden in alle mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat markierten Proteine auch radioaktive Zucker eingebaut. Die für die Entwicklung der Zellen bedeutsamen Membranproteine scheinen fast ausschliesslich Glykoproteine zu sein. Auffällig intensiven Einbau radioaktiver Substanzen während der Entwicklung zeigen die Proteine mit Molekulargewichten von 27, 36, 50, 53, 57, 66, 71, 74, 110, 120, und 300 kd (die markantesten Banden des Autoradiogramms sind unterstrichen). Aktin und Myosin werden während des ganzen Differenzierungsprozesses stark mit  $^{14}\text{C}$ -Acetat markiert.
- Bei drei Proteinen mit Molekulargewichten von 57, 71 und 110 kd wird eine Funktion in der Zelladhäsion vermutet. Sie werden während der Entwicklung neu synthetisiert, sind stark antigenische Glykoproteine der Zelloberfläche und lassen sich mit Butanol extrahieren.

# ABKUERZUNGEN

|                  |                                                                     |
|------------------|---------------------------------------------------------------------|
| ADP              | Adenosin-5'-diphosphat                                              |
| AMP              | Adenosin-5'-monophosphat                                            |
| ATP              | Adenosin-5'-triphosphat                                             |
| cAMP             | 3',5'-zyklisches Adenosinmonophosphat                               |
| Con A            | Concanavalin A                                                      |
| cpm              | counts per minute (Radioaktivität)                                  |
| dpm              | disintegrations per minute                                          |
| DNFB             | Dinitrofluorbenzol                                                  |
| DTT              | Dithiothreitol (= Cleland's Reagent)                                |
| EDTA             | Aethylendiamin-tetra-Essigsäure                                     |
| EGTA             | Aethylenglykol-bis( $\beta$ -aminoäthyläther)-N,N'-tetra-Essigsäure |
| $g_{av}$         | Beschleunigung bei mittlerem Radius (Zentrifugation)                |
| GTP              | Guanosin-5'-triphosphat                                             |
| INA              | 5-( $^{125}I$ )-Iodonaphthylazid                                    |
| k <sub>d</sub>   | Kilodalton (Molekulargewicht)                                       |
| MG               | Molekulargewicht                                                    |
| NADH             | Nikotinamid-Adenindinukleotid, reduziert                            |
| NADPH            | Nikotinamid-Adenindinukleotidphosphat, reduziert                    |
| NAP <sub>4</sub> | N-4-Azido-2-Nitrophenyl-Aminobutyrat                                |
| P <sub>i</sub>   | anorganisches Phosphat                                              |
| PEI              | Polyäthylenimin (-Zellulose)                                        |
| PM               | Plasmamembran                                                       |
| PPO              | 2,5-Diphenyloxazol                                                  |
| SDS              | Sodiumdodecylsulfate = Natriumlaurylsulfat                          |
| Tricin           | N-[tris(hydroxymethyl)-methyl]-glycin                               |
| Tris             | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan                                    |
| w/v              | Gewicht pro Volumen (bei Konzentrationsangaben)                     |

# LITERATURVERZEICHNIS

- Amrhein, N. 1977. The current status of cyclic AMP in higher plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 28: 123-132.
- Bercovici, T. and C. Gitler. 1978. 5-(<sup>125</sup>I)-Iodonaphthylazide, a reagent to determine the penetration of proteins into the lipid bilayer of biological membranes. *Biochemistry* 17: 1484-1489.
- Bergmeyer, H.U. 1970. Methoden der enzymatischen Analyse, I + II, pp. 2220. Verlag Chemie, Weinheim.
- Beug, H., G. Gerisch, S. Kempff, V. Riedel and G. Cremer. 1970. Specific inhibition of cell contact formation in Dictyostelium by univalent antibodies. *Exp. Cell Res.* 63: 147-158.
- Beug, H., F.E. Katz and G. Gerisch. 1973. Dynamics of antigenic membrane sites relating to cell aggregation in Dictyostelium discoideum. *J. Cell Biol.* 56: 647-658.
- Bonner, J.T. 1947. Evidence for the formation of cell aggregates by chemotaxis in the development of the slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Exp. Zool.* 106: 1-26.
- Bonner, J.T. 1967. The cellular slime molds, 2nd edn., pp. 205. Princeton Univ. Press.
- Bonner, J.T. 1970. Induction of stalk cell differentiation by cyclic AMP in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 65: 110-113.
- Bonner, J.T., E.M. Hall, S. Noller, F.B. Oleson, Jr. and A.B. Roberts. 1972. Synthesis of cyclic AMP and phosphodiesterase in various species of cellular slime molds and its bearing on chemotaxis and differentiation. *Develop. Biol.* 29: 402-409.
- Bonner, W.M. and R.A. Laskey. 1974. A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels. *Eur. J. Biochem.* 46: 83-88.

- Bozzaro, S. and G. Gerisch. 1978. Contact sites in aggregating cells of *Polysphondylium pallidum*. *J. Mol. Biol.* 120: 265-279.
- Brackenbury, R., J.P. Thiery, U. Rutishauser and G.M. Edelman. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. I. An immunological assay for molecules involved in cell-cell binding. *J. Biol. Chem.* 252: 6835-6840.
- Chang, C.-M., R.W. Reitherman, S.D. Rosen and S.H. Barondes. 1975. Cell surface location of discoidin, a developmentally regulated carbohydrate-binding protein from *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* 95: 136-142.
- Charlesworth, M.R. and R.W. Parish. 1977. Further studies on basic nucleoproteins from the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Eur. J. Biochem.* 75: 241-250.
- Chlapowski, F.J. and R.W. Butcher. 1973. Subcellular distribution of adenyl cyclase and phosphodiesterase in *Acanthamoeba Palestinensis*. *Biochim. Biophys. Acta* 309: 138-148.
- Clarke, M. and J.A. Spudich. 1974. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. Isolation and characterization of myosin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 86: 209-222.
- Condeelis, J. 1979. Isolation of Concanavalin A caps during various stages of formation and their association with actin and myosin. *J. Cell Biol.* 80: 751-758.
- Cross, J.W. and W.R. Briggs. 1977. Labelling of membranes from erythrocytes and corn with fluorescamine. *Biochim. Biophys. Acta* 471: 67-77.
- Dawson, R.M.C., D.C. Elliott, W.H. Elliott and K.M. Jones, eds. 1969. *Data for biochemical research*, pp. 462. Oxford Clarendon Press.
- De Pierre, J.W. and M.L. Karnovsky. 1973. Plasma membranes of mammalian cells, a review of methods for their characterization and isolation. *J. Cell Biol.* 56: 275-303.

- Durston, A.J. and F. Vork. 1979. A cinematographical study of the development of vitally stained *Dictyostelium discoideum*. *J. Cell Sci.* 36: 261-279.
- Farnham, C.J.M. 1975. Cytochemical localization of adenylate cyclase and 3',5'-nucleotide phosphodiesterase in *Dictyostelium*. *Exp. Cell Res.* 91: 38-46.
- Fortes, P.A.G., J.C. Ellory and V.L. Lew. 1973. Suramin: a potent ATPase inhibitor which acts on the inside surface of the sodium pump. *Biochim. Biophys. Acta* 318: 262-272.
- Francis, D. 1975. Cyclic AMP-induced changes in protein synthesis in a cellular slime mold, *Polysphondylium pallidum*. *Nature* 258: 763-765.
- Francis, D. 1976. Changes in protein synthesis during alternate pathways of differentiation in the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *Develop. Biol.* 53: 62-72.
- Francis, D. 1977. Synthesis of developmental proteins in morphogenetic mutants of *Polysphondylium pallidum*. *Develop. Biol.* 55: 339-346.
- Frazier, W.A. 1976. The role of cell surface components in the morphogenesis of the cellular slime molds. *Trends in Biochem. Sci.* 1: 130-133.
- Gerisch, G. and D. Malchow. 1976. Cyclic AMP receptors and the control of cell aggregation in *Dictyostelium*. In: *Adv. cyclic nucleo. Res.* 7: 49-68. P. Greengard and G.A. Robison, eds. Raven Press, New York.
- Gerisch, G. 1977. Membrane sites implicated in cell adhesion: Their developmental control in *Dictyostelium discoideum*. In: *International Cell Biology 1976-1977*, pp. 36-42, eds. R.R. Brinkley and K.R. Porter. Rockefeller Univ. Press, New York.
- Gezelius, K. and B.E. Wright. 1965. Alkaline phosphatase in *Dictyostelium discoideum*. *J. Gen. Microbiol.* 38: 309-327.

- Gilkes, N.R. and G. Weeks. 1977. The purification and characterization of *Dictyostelium discoideum* plasma membranes. *Biochim. Biophys. Acta* 464: 142-156.
- Goldmann, R., T. Pollard and J. Rosenbaum, eds. 1976. Cell motility. Cold Spring Harbor Conferences on Cell Proliferation. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Greaves, M.F., J.J.T. Owen and M.C. Raff. 1974. T and B lymphocytes: origins, properties and roles in immune responses. American Elsevier, New York.
- Green, A.A. and P.C. Newell. 1974. The isolation and sub-fractionation of plasma membrane from the cellular slime mould *Dictyostelium discoideum*. *Biochem. J.* 140: 313-322.
- Greengard, P. and E. Costa, eds. 1970. Role of cyclic AMP in cell function. *Adv. biochem. Psychopharm.* 3, pp. 386. Raven Press, New York.
- Hausman, R.E. and A.A. Moscona. 1976. Isolation of a retina-specific cell-aggregating factor from membranes of embryonic neural retina tissue. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 3594-3598.
- Hechter, O., H.P. Baer, M. Matsuba and D. Soifer. 1969. ACTH-sensitive adenyl cyclase in bovine adrenal cortex membrane fractions. *Life Sciences* 8: 935-942.
- Hintermann, R. 1974. Membranfraktionen von *Dictyostelium discoideum*. Diplomarbeit, Inst. für Pflanzenbiologie, Universität Zürich.
- Hintermann, R. and R.W. Parish. 1979. Determination of adenylate cyclase activity in a variety of organisms: evidence against the occurrence of the enzyme in higher plants. *Planta* 146: 459-461.
- Hohl, H.R., R. Honegger, F. Traub and M. Markwalder. 1977. Influence of cAMP on cell differentiation and morphogenesis in *Polysphondylium*. In: Development and Differentiation in the Cellular Slime Moulds, pp. 149-172. Eds. P. Cappuccinelli and J.M. Ashworth. Elsevier, Amsterdam-New York.

- Holtfreter, J. 1939. Tissue affinity, a means of embryological morphogenesis. In: Foundations in Experimental Embryology. B. Willier and J. Oppenheimer, eds. 1964. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J., pp. 186-225.
- Huesgen, A. and G. Gerisch. 1975. Solubilized contact sites A from cell membranes of Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 56: 46-49.
- Hynes, R.O. 1976. Cell surface proteins and malignant transformation. Biochim. Biophys. Acta 458: 73-107.
- Jones, M.E. and A. Robertson. 1976. Cyclic adenosine monophosphate and the development of Polysphondylium. J. Cell Sci. 22: 41-47.
- King, A.C. and W.A. Frazier. 1977. Reciprocal periodicity in cyclic AMP binding and phosphorylation of differentiating Dictyostelium discoideum cells. Biochem. Biophys. Res. Comm. 78: 1093-1099.
- Klein, C. 1976. Adenylate cyclase activity in Dictyostelium discoideum amoebae and its changes during differentiation. FEBS Lett. 68: 125-128.
- Klein, C., P. Brachet and M. Darmon. 1977. Periodic changes in adenylate cyclase and cAMP receptors in Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 76: 145-147.
- Konijn, T.M., J.G.C. van de Meene, J.T. Bonner and D.S. Barkley. 1967. The acrasin activity of adenosine-3',5'-cyclic phosphate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 58: 1152-1154.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T 4. Nature 227: 680-685.
- Laskey, R.A. and A.D. Mills. 1975. Quantitative film detection of  $^3\text{H}$  and  $^{14}\text{C}$  in polyacrylamide gels by fluorography. Eur. J. Biochem. 56: 335-341.
- Lauquin, G.J.M., G. Brandolin, J. Lunardi and P.V. Vignais. 1978. Photoaffinity labelling of the adenine nucleotide carrier in heart and yeast mitochondria by an arylazido-

- ADP analog. *Biochim. Biophys. Acta* 501: 10-19.
- Lazarides, E. 1976. Actin,  $\alpha$ -actinin and tropomyosin interaction in the structural organization of actin filaments in non-muscle cells. *J. Cell Biol.* 68: 202-219.
- Lazarides, E. and J.P. Revel. 1979. *Molekulare Grundlagen der Zellbewegung. Spektrum d. Wiss.* 1: 22-31.
- Londos, C. and J. Wolff. 1977. Two distinct adenosine-sensitive sites on adenylate cyclase. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 74: 5482-5486.
- Loomis, W.F. 1975. *Dictyostelium discoideum*. A developmental system, pp. 214. Acad. Press, New York.
- Lowry, O.H., N.J. Rosebrough, A.L. Farr and R.J. Randall. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275.
- Maddy, A.H. 1966. The properties of the protein of the plasma membrane of ox erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 117: 193-200.
- Maeda, Y. and G. Gerisch. 1977. Vesicle formation in *Dictyostelium discoideum* cells during oscillations of cAMP synthesis and release. *Exp. Cell Res.* 110: 119-126.
- Mannherz, H.G. and R.S. Goody. 1976. Proteins of contractile systems. *Ann. Rev. Biochem.* 45: 427-465.
- Marchalonis, J.J., R.E. Cone and V. Sauter. 1971. Enzymic iodination. A probe for accessible surface proteins of normal and neoplastic lymphocytes. *Biochem. J.* 124: 921-927.
- Marchesi, V.T., ed. 1976. *Membranes and neoplasia: New approaches and strategies*. Less, New York 1976.
- Mato, J.M. and T.M. Konijn. 1976. The activation of cell aggregation by phosphorylation in *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell. Res.* 99: 328-332.
- Mc Mahon, D., M. Miller and S. Long. 1977. The involvement of the plasma membrane in the development of *Dictyostelium discoideum*. I. Purification of the plasma membrane. *Biochim. Biophys. Acta* 465: 224-241.

- Müller, K. and G. Gerisch. 1978. A specific glycoprotein as the target site of adhesion blocking Fab in aggregating Dictyostelium cells. *Nature* 274: 445-449.
- Müller, U. and H.R. Hohl. 1973. Pattern formation in Dictyostelium discoideum: Temporal and spacial distribution of prespore vacuoles. *Differentiation* 1: 267-276.
- Nachmias, V.T. 1976. Adenosine 5'-phosphate and assembly of actin filaments in vitro. *J. Mol. Biol.* 107: 623-629.
- Newell, P.C. and M. Sussman. 1969. Uridine diphosphate glucose pyrophosphorylase in Dictyostelium discoideum. *J. Biol. Chem.* 244: 2990-2995.
- Newell, P.C., A. Telser and M. Sussman. 1969. Alternative developmental pathways determined by environmental conditions in the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Bacteriol.* 100: 763-768.
- Newell, P.C., M. Longlands and M. Sussman. 1971. Control of enzyme synthesis by cellular interaction during development of the cellular slime mold Dictyostelium discoideum. *J. Mol. Biol.* 58: 541-554.
- Nicolson, G.L. 1976. Trans-membrane control of the receptors on normal and tumor cells. II. Surface changes associated with transformation and malignancy. *Biochim. Biophys. Acta* 458: 1-72.
- Noll, H., V. Matrangola, D. Cascino and L. Vittorelli. 1979. Reconstitution of membranes and embryonic development in dissociated blastula cells of the sea urchin by reinsertion of aggregation-promoting membrane proteins extracted with butanol. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 76: 288-292.
- Olden, K., M. Willingham and I. Pastan. 1976. Cell surface myosin in cultured fibroblasts. *Cell* 8: 383-390.
- Owen, M.J., J. Anger, B.H. Barber, A.J. Edwards, F.S. Walsh and M.J. Crumpton. 1978. Actin may be present on the lymphocyte surface. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 75: 4484-4488.

- Parish, R.W. and C. Pelli. 1974. Alkaline Phosphatase of Dictyostelium discoideum: Cell surface location and colchicine effect on internalization during phagocytosis. FEBS Lett. 48: 293-296.
- Parish, R.W. and Müller U. 1976. The Isolation of plasma membranes from the cellular slime mold Dictyostelium discoideum using Concanavalin A and Triton X-100. FEBS Lett. 63 40-44.
- Parish, R.W., S. Schmidlin and U. Müller. 1977a. The effects of proteases on proteins and glycoproteins of Dictyostelium discoideum plasma membranes. Exp. Cell. Res. 110: 267-276.
- Parish, R.W., U. Müller and S. Schmidlin. 1977b. Phosphorylation of plasma membrane proteins in Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 79: 393-395.
- Parish, R.W., S. Schmidlin and M. Weibel. 1978a. Effect of cyclic AMP pulses on the synthesis of plasma membrane proteins in aggregateless mutants of Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 96: 283-286.
- Parish, R.W., S. Schmidlin and C.R. Parish. 1978b. Detection of developmentally controlled plasma membrane antigens of Dictyostelium discoideum cells in SDS-polyacrylamide gels. FEBS Lett. 95: 366-370.
- Parish, R.W. 1979. Cyclic AMP induces the synthesis of developmentally regulated plasma membrane proteins in Dictyostelium. Biochim. Biophys. Acta 553: 179-182.
- Parish, R.W. and S. Schmidlin. 1979a. Synthesis of plasma membrane proteins during development of Dictyostelium discoideum. FEBS Lett. 98: 251-256.
- Parish, R.W. and S. Schmidlin. 1979b. Resynthesis of developmentally regulated plasma membrane proteins following disaggregation of Dictyostelium pseudoplasmodia. FEBS Lett. 99: 270-274.
- Pastan, I. and R. Perlman. 1971. Cyclic AMP in metabolism. Nature New Biology 229: 5-7.

- Pearlstein, E. 1976. Plasma membrane glycoprotein which mediates adhesion of fibroblasts to collagen. *Nature* 262: 497-500.
- Philippi, M.L. 1978. Encystierung bei *Polysphondylium pallidum*. Dissertation, Inst. für Pflanzenbiologie, Universität Zürich, pp 88.
- Pollard, T.D. and R.R. Weihing. 1974. Actin and myosin and cell movement. *Crit. Rev. Biochem.* 2: 1-65.
- Prémont, J., M. Perez and J. Bockaert. 1977a. Adenosine-sensitive adenylate cyclase in rat striatal homogenates and its relationship to dopamine- and  $\text{Ca}^{++}$ -sensitive adenylate cyclases. *Mol. Pharm.* 13: 662-670.
- Prémont, J., M. Perez and J. Bockaert. 1977b. Adenosine-sensitive adenylate cyclase in rat striatal homogenates. *FEBS Lett.* 75: 209-212.
- Rahmsdorf, H.J., D. Malchow and G. Gerisch. 1978. Cyclic AMP-induced phosphorylation in *Dictyostelium* of a polypeptide comigrating with myosin heavy chains. *FEBS Lett.* 88: 322-326.
- Rahmsdorf, H.J., D. Malchow and G. Gerisch. 1979. Cell surface protein kinases in *Dictyostelium*: Are they artifacts? *Cell Biol. Internatl. Rep.* 3: 237-245.
- Raper, K.B. 1951. Isolation, cultivation and conservation of simple slime molds. *Quart. Rev. Biol.* 26: 169-190.
- Ray, J., T. Shinnick and R. Lerner. 1979. A mutation altering the function of a carbohydrate binding protein blocks cell-cell cohesion in developing *Dictyostelium discoideum*. *Nature* 279: 215-221.
- Reitherman, R.W., S.D. Rosen, W.A. Frazier and S.H. Barondes. 1975. Cell surface species-specific high affinity receptors for discoidin: Developmental regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 3541-3545.

- Riedel, V. und G. Gerisch. 1968. Isolierung der Zellmembranen von kollektiven Amöben (Acrasina) mit Hilfe von Digitonin und Filipin. *Naturwissenschaften* 55: 656.
- Roos, W. and G. Gerisch. 1976. Receptor-mediated adenylate cyclase activation in *Dictyostelium discoideum*. *FEBS Lett.* 68: 170-172.
- Roos, W., D. Malchow and G. Gerisch. 1977. Adenylyl cyclase and the control of cell differentiation in *Dictyostelium discoideum*. *Cell Differentiation* 6: 229-239.
- Rosen, S.D., J.A. Kafka, D.L. Simpson and S.H. Barondes. 1973. Developmentally regulated carbohydrate-binding protein in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 2554-2557.
- Rosen, S.D., D.L. Simpson, J.E. Rose and S.H. Barondes. 1974. Carbohydrate-binding protein from *Polysphondylium pallidum* implicated in intercellular adhesion. *Nature* 252: 128 + 149-151.
- Rosen, S.D., R.W. Reitherman and S.H. Barondes. 1975. Distinct lectin activities from six species of cellular slime molds. *Exp. Cell Res.* 95: 159-166.
- Rossomando, E.F. and M. Sussman. 1972. Adenyl cyclase in *Dictyostelium discoideum*: a possible control element of the chemotactic system. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 47: 604-610.
- Rossomando, E.F. and M. Sussman. 1973. A 5'-adenosine monophosphate-dependent adenylate cyclase and an adenosine 3',5'-cyclic monophosphate-dependent adenosine triphosphate pyrophosphohydrolase in *Dictyostelium discoideum*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 1254-1257.
- Rossomando, E.F. and L.S. Cutler. 1975. Localization of adenylate cyclase in *Dictyostelium discoideum*. *Exp. Cell Res.* 95: 67-78.
- Rossomando, E.F. and M.A. Hesla. 1976. Time-dependent changes in *Dictyostelium discoideum* adenylate cyclase activity upon incubation with ATP. *J. Biol. Chem.* 251: 6568-6573.

- Rutishauser, U., J.-P. Thiéry, R. Brackenbury, B.-A. Sela and G.M. Edelman. 1976. Mechanisms of adhesion among cells from neural tissues of the chick embryo. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 577-581.
- Rutishauser, U., J.-P. Thiéry, R. Brackenbury and G.M. Edelman. 1978a. Adhesion among neural cells of the chick embryo. III. Relationship of the surface molecule CAM to cell adhesion and the development of histotypic patterns. *J. Cell Biol.* 79: 371-381.
- Rutishauser, U., W.E. Gall and G.M. Edelman. 1978b. Adhesion among neural cells of the chick embryo. IV. Role of the cell surface molecule CAM in the formation of neurite bundles in cultures of spinal ganglia. *J. Cell Biol.* 79: 382-393.
- Sahyoun, N., C.J. Schmitges, M.I. Siegel and P. Cuatrecasas. 1976. 2'-deoxyadenosine-3'-monophosphate: a naturally occurring inhibitor of adenylate cyclase in amphibian and mammalian cells. *Life Sciences* 19: 1961-1970.
- Salomon, Y., C. Londos and M. Rodbell. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal. Biochem.* 58: 541-548.
- Sievers, S., H.J. Risse and K.H. Sekeri-Pataryas. 1978. Localization of glycosyl transferases in plasma membranes from *Dictyostelium discoideum*. *Mol. Cell Biochem.* 20: 103-110.
- Simpson, D.L., S.D. Rosen and S.H. Barondes. 1975. Pallidin. Purification and characterization of a carbohydrate-binding protein from *Polysphondylium pallidum* implicated in intercellular adhesion. *Biochim. Biophys. Acta* 412:109-119.
- Singer, S.J. and G.L. Nicolson. 1972. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* 175: 720-731.
- Siu, C.-H., R.A. Lerner, G. Ma, R.A. Firtel and W.F. Loomis. 1976. Developmentally regulated proteins of the plasma membrane of *Dictyostelium discoideum*: the carbohydrate-binding protein. *J. Mol. Biol.* 100: 157-175.

- Siu, C.-H., R.A. Lerner and W.F. Loomis. 1977. Rapid accumulation and disappearance of plasma membrane proteins during development of wild-type and mutant strains of *Dictyostelium discoideum*. *J. Mol. Biol.* 116: 469-488.
- Soifer, D. and D. Hechter. 1971. Adenyl cyclase activity in rat liver nuclei. *Biochim. Biophys. Acta* 230: 539-542.
- Sonneborn, D.R., M. Sussman and L. Levine. 1964. Serological analysis of cellular slime mold development. I. Changes in antigenic activity during cell aggregation. *J. Bacteriol.* 87: 1321-1329.
- Spudich, J.A. 1974. Biochemical and structural studies of actomyosin-like proteins from non-muscle cells. II. Purification, properties, and membrane association of actin from amoebae of *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 249: 6013-6020.
- Sussman, M. 1961. Cultivation and serial transfer of the slime mold *Dictyostelium discoideum* in liquid nutrient medium. *J. Gen. Microbiol.* 25: 375-378.
- Sussman, M. and J. Schindler. 1978. A possible mechanism of morphogenetic regulation in *Dictyostelium discoideum*. *Differentiation* 10: 1-5.
- Sutherland, E.W., T.W. Rall and T. Menon. 1962. Adenyl cyclase I. Distribution, preparation and properties. *J. Biol. Chem.* 237: 1220-1227.
- Thiéry, J.-P., R. Brackenbury, U. Rutishauser and G.M. Edelman. 1977. Adhesion among neural cells of the chick embryo. II. Purification and characterization of a cell adhesion molecule from neural retina. *J. Biol. Chem.* 252: 6841-6845.
- Trams, E.G. and C.J. Lauter. 1974. On the sidedness of plasma membrane enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 345: 180-197.
- Traub, F. 1972. Acrasiales in Schweizer Wäldern. Diplomarbeit, Inst. für Pflanzenbiologie, Universität Zürich.
- Weinstein, B.I. and S.B. Koritz. 1973. A protein kinase assayable with intact cells of the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Develop. Biol.* 34: 159-162.

- Wohlfarth-Bottermann, K.E. 1977. Cytoplasmatische Aktomyosine und ihre Bedeutung für die Zellbewegung. Rheinisch-Westfälische Akademie der Wissenschaften, Vorträge, 269: 7-50.
- Wood, J.G. and F.O. Sarinana. 1975. The staining of sciatic nerve glycoproteins on polyacrylamide gels with Concanavalin A-peroxidase. Anal. Biochem. 69: 320-322.
- Wurster, B., P. Pan, G. Tyan and J.T. Bonner. 1976. Preliminary characterization of the acrasin of the cellular slime mold *Polysphondylium violaceum*. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 795-799.



## PUBLIKATIONEN

Einzelne Teile dieser Dissertation wurden publiziert:

Hintermann, R. and R.W. Parish. 1979. The intracellular location of adenylyl cyclase in the cellular slime molds *Dictyostelium discoideum* and *Polysphondylium pallidum*. *Exp. Cell Res.* 123: 429-434.

Hintermann, R. and R.W. Parish. 1979. Synthesis of plasma membrane proteins and antigens during development of the cellular slime mold *Polysphondylium pallidum*. *FEBS Lett.* 108: 219-225.

Steinemann, C., R. Hintermann and R.W. Parish. 1979. Identification of a developmentally regulated plasma membrane glycoprotein involved in adhesion of *Polysphondylium pallidum* cells. *FEBS Lett.* 108: 379-384.

Eine weitere Arbeit ist im Text erwähnt, die Resultate sind in der Dissertation jedoch nicht enthalten:

Hintermann, R. and R.W. Parish. 1979. Determination of adenylate cyclase activity in a variety of organisms: Evidence against the occurrence of the enzyme in higher plants. *Planta* 146: 459-461.



## LEBENS LAUF

Name                    Rudolf Hintermann  
geboren                6. April 1949 in Aarau  
Bürgerort             Beinwil am See AG  
Schulen                1956-1961 Primarschule in Birrwil AG  
                         1961-1965 Bezirksschule in Reinach AG  
                         1965-1969 Lehrerseminar in Wettingen  
Studium                1969-1974 Universität Zürich  
                         1974            Diplom, Hauptfach Allgemeine Botanik  
                         1975-1979 Arbeit an der Dissertation im Institut  
                         für Pflanzenbiologie der Universität  
                         Zürich

Leitung der  
Diplomarbeit        Prof. Dr. R.W. Parish und Prof. Dr. H.R. Hohl

Leitung der  
Dissertation        Prof. Dr. R.W. Parish

gegenwärtige  
Stellung             Hilfslehrer am Kt. Seminar in Brugg AG

Verzeichnis  
der Dozenten        Bachofen, R., Biegert, J., Billeter, M., Burla,  
                         H., Chen, P.S., Cook, C.D.K., Endress, P.,  
                         Eugster, C.H., Hadorn, E., Hediger, H., Hohl,  
                         H.R., Humbel, R., Hunsperger, R., Kägi, J.,  
                         Knüsel, F., Kummer, H., Jungen, H., Jungen-  
                         Hauschteck, E., Leuthardt, F., Oswald, H.R.,  
                         Parish, R.W., Rast, D., Rohweder, O., Schaeppi,  
                         H., Schlittler, J., Schmid, H., Stüssi, B.,  
                         Tardent, P., Thomas, E., Van der Waerden, B.L.,  
                         Wanner, H., Weber, H., Wehner, R., Weissmann,  
                         Ch., Ziswiler, V.









